

Resistentie tegen antimicrobiële middelen
van bacteriën voorkomend binnen en
buiten het ziekenhuis

Resistentie tegen antimicrobiële middelen van bacteriën voorkomend binnen en buiten het ziekenhuis

(Bacterial Drug Resistance in the Community and in Hospitals)

PROEFSCHRIFT

Ter verkrijging van de graad van doctor in de
geneeskunde
aan de Erasmus Universiteit Rotterdam
op gezag van de Rector Magnificus
Prof. Dr. J. Sperna Weiland
en volgens besluit van het college van dekanen.
De openbare verdediging zal plaatsvinden op
woensdag 12 oktober 1983
te 15.45 uur

door

John Edward Degener
geboren te 's-Gravenhage

1983
NKB-OFFSET B.V.
Bleiswijk

Promotoren: Prof.Dr. M.F. Michel
Prof.Dr. H.A. Valkenburg

Voor Willie, Louisa en Clementine

INHOUDSOPGAVE.

Hoofdstuk I	INLEIDING EN VRAAGSTELLING.	1
Hoofdstuk II	ISOLATIE VAN BACTERIESTAMMEN UIT FAECES EN GEVOELIGHEIDSBEPALING.	5
	II.1. ISOLATIE VAN GEVOELIGE EN RESISTENTE BACTERIESTAMMEN UIT FAECES.	5
	II.2. BEPALING VAN DE GEVOELIGHEID VAN BACTERIESTAMMEN VOOR EEN REEKS ANTIMICROBIËLE MIDDELEN.	7
Hoofdstuk III	HET DRAGERSCHAP VAN AËROBE GRAM- NEGATIEVE STAVEN EN RESISTENTIE VAN <i>ESCHERICHIA COLI</i> VOOR ANTIMICROBIËLE MIDDELEN BUITEN HET ZIEKENHUIS.	23
Appendix	CASE CONTROL ONDERZOEK NAAR RISICO- FAKTOREN VOOR HET DRAGERSCHAP VAN OVERWEGEND RESISTENTE <i>ESCHERICHIA COLI</i> FLORA IN FAECES.	33
Hoofdstuk IV	ONDERZOEK NAAR DE RELATIE TUSSEN DE RESISTENTIE VAN <i>ESCHERICHIA COLI</i> EN HET GEBRUIK VAN ANTIMICROBIËLE MIDDELEN OP VERSCHILLENDE ZIEKENHUISAFDELINGEN.	41
Appendix	ACQUISITIE VAN RESISTENTE <i>ESCHERICHIA COLI</i> IN DE DARM TIJDENS VERBLIJF IN HET ZIEKENHUIS.	53
Hoofdstuk V	RESISTENTIEPATRONEN VAN <i>ESCHERICHIA COLI</i> STAMMEN, GEÏSOLEERD UIT FAECESMONSTERS, BINNEN EN BUITEN HET ZIEKENHUIS.	57
Hoofdstuk VI	CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN.	69
	SAMENVATTING.	75
	SUMMARY.	79
	LITERATUUR.	83

Hoofdstuk I

Inleiding en vraagstelling.

In Nederland is tot nu toe geen systematische studie verricht naar het voorkomen van resistentie voor antimicrobiële middelen bij bacteriën. Deze informatie is van belang voor het bepalen van de omvang van de bacteriële resistentie en om een uitspraak te kunnen doen over de bruikbaarheid van de gangbare antimicrobiële middelen. Ziekenhuispatiënten en mensen buiten het ziekenhuis of de open bevolking zijn in verschillende mate aan deze middelen blootgesteld. Studies over de omvang van de resistentie waren dan ook als regel op deze groepen gericht.

Onderzoek buiten het ziekenhuis. Onderzoek naar bacteriële resistentie buiten het ziekenhuis is ongeveer 10 jaar geleden op verschillende plaatsen verricht. Dit onderzoek was beperkt van omvang. In Borneo werden bij een etnisch geïsoleerde bevolking in 19% van 128 faecesmonsters coliformen gevonden die resistent waren voor ampicilline, tetracycline, chlooramfenicol, kanamycine of sulfonamide (Davis e.a. 1970). Onderzoek dat met dezelfde techniek ongeveer gelijktijdig bij westerse bevolkingsgroepen werd uitgevoerd, leverde telkens hogere frequenties van resistente bacteriestammen op (Guinée e.a. 1970, Datta e.a. 1971, Linton e.a. 1972). Patiënten, die in Londen een huisartspraktijk bezochten, waren in 30% van de gevallen drager van *E. coli* stammen, die resistent waren voor één of meer van zeven onderzochte antimicrobiële middelen. Deze patiënten gebruikten geen antimicrobiële middelen (Datta e.a. 1971). Ongeveer hetzelfde resultaat werd gevonden in Bristol; alleen bleek daar dat bij kinderen vaker dan bij volwassenen en op het platteland vaker dan in de stad resistente stammen werden aangetroffen (Linton e.a. 1972). Bij kantoorpersoneel in Utrecht werd bij 38% tetracycline-resistente *E. coli* gevonden (Guinée e.a. 1970). Resistentie die in deze drie studies voor drie in de huisartspraktijk veel gebruikte middelen werd gevonden, is samengevat in tabel I. Het mechanisme van de resistentie bleek in de meeste gevallen te berusten op de aanwezigheid van overdraagbare resistentie-plasmiden (Falkow 1976, Broda 1979). Met deze studies wordt de oorzaak van het frequent voorkomen van resistentie niet opgehelderd. Of er sprake is van een toename van resistentie ten gevolge van het gebruik van antimicrobiële middelen is niet duidelijk, omdat er geen gegevens beschik-

Tabel I. Prevalentie van aërobe Gram-negatieve staven, resistent voor tetracycline, ampicilline en sulfonamide in verschillende epidemiologische studies.*

auteur en jaartal	plaats	populatie	aantal faeces-monsters	soort	percentage monsters met resistente stammen*			antimicrobieel middel waarmee onderzoek plaatsvond*
					T	A	S	
Datta, 1971	Londen U.K.	patiënten in de huisartspraktijk, zonder therapie	53	E. coli	17	2	23	T (10), A (25), S (100)
Linton e.a. 1972	Bristol U.K.	1. volwassen gezinsleden van kinderen die een consultatiebureau bezoeken	97	Coliformen	19	13	-	T (25), A (25)
		2. kinderen die een consultatiebureau bezoeken	96	"	24	36	-	" "
		3. volwassenen, niet-stedelingen	43	"	47	42	-	" "
		4. kinderen, niet-stedelingen	28	"	68	57	-	" "
Guinée e.a. 1970	Utrecht	kantoorpersoneel	86	E. coli	38	-	-	T (30)

T = tetracycline, A = ampicilline, S = sulfonamide

() = concentratie in µg/ml

* De studies werden met vergelijkbare technieken uitgevoerd.

baar zijn over de frequentie van resistentie in de periode dat het gebruik van antimicrobiële middelen nog schaars was. Als mogelijke bron van waaruit grote hoeveelheden resistente stammen de open bevolking kunnen bereiken, wordt de intensieve veehouderij genoemd. Zowel ter bestrijding van infecties als ter bevordering van de groei van jong vee worden antimicrobiële middelen aan het voer toegevoegd. Dit geeft aanleiding tot excretie van grote hoeveelheden resistente stammen (Mercer e.a. 1971, Burton e.a. 1974, Guinée e.a. 1974A, Siegel e.a. 1974, Hartley e.a. 1975, Levy e.a. 1976, Ahart e.a. 1978). De kanalen waarlangs verspreiding van deze stammen plaatsvindt zijn oppervlaktewater (Sturtevant e.a. 1969, Cooke 1976) en de voedselketen (Shooter e.a. 1970, Cooke e.a. 1971, Linton e.a. 1977B). Een oplossing van dit probleem is gezocht in beperking van het gebruik van antimicrobiële middelen bij jong vee (Joint Committee 1969, Gezondheidsraad-Voedingsraad 1977). In EEG verband werd reeds in 1974 aan deze praktijk beperkingen opgelegd. Daarna nam althans bij *Salmonella* de frequentie van resistentie tegen tetracycline in Nederland af (Van Leeuwen e.a. 1979).

Onderzoek in het ziekenhuis. Over het voorkomen van resistentie in het ziekenhuis is aanzienlijk meer bekend. Studies over dit onderwerp kunnen in drie categorieën worden onderverdeeld. De eerste categorie omvat verreweg de meeste studies. Deze betreffen beschrijvingen van epidemische verheffingen van infecties met resistente bacteriestammen van dezelfde soort of van hetzelfde type (Selden e.a. 1971, Curie e.a. 1978, O'Callaghan e.a. 1978, Markowitz e.a. 1980, Weinstein e.a. 1980, Duncan e.a. 1981). In dit soort studies zijn typeringstechnieken en het aantonen van infectieuze resistentie door plasmiden van belang. In studies van de tweede categorie is getracht op grond van systematisch onderzoek bij patiënten in het ziekenhuis de omvang van de resistentie vast te stellen (Salzman e.a. 1966, Block 1969, Datta 1969). Uit deze studies is gebleken dat verblijf in het ziekenhuis kan leiden tot acquisitie van resistente stammen in de darm terwijl bovendien de dichtheid van resistente stammen in de darm toeneemt. Uit studies van de derde categorie blijkt dat er een verband bestaat tussen het gebruik van antimicrobiële middelen in het ziekenhuis en het voorkomen van uit klinisch materiaal geïsoleerde resistente bacteriestammen (Bauer e.a. 1960, Bulger e.a. 1970, Price e.a. 1970, Mouton e.a. 1976).

In dit proefschrift wordt de omvang van de bacteriële resistentie binnen en buiten het ziekenhuis in de Nederlandse situatie bestudeerd. Om

de bacteriële resistentie goed te kunnen definiëren is met de toegepaste bacteriologische techniek aansluiting gezocht bij in andere onderzoeken gehanteerde technieken (Guinée e.a. 1970, Datta e.a. 1971, Linton e.a. 1972) (hoofdstuk II). Het betreft een techniek voor de isolatie van resistente aërobe Gram-negatieve staven uit faeces. Om de gevoeligheid van de geïsoleerde bacteriestammen voor een uitgebreide reeks antimicrobiële middelen te kunnen bepalen, moest eerst een vergelijkend onderzoek worden verricht naar de betrouwbaarheid van een aantal beschikbare technieken. In hoofdstuk II worden de resultaten van dit onderzoek gepresenteerd en wordt de motivatie voor de keuze van een gemechaniseerde methode toegelicht. In de hoofdstukken III t/m V wordt een poging ondernomen om met behulp van deze technieken een antwoord te geven op de volgende vragen:

1. Wat is op dit moment de omvang van de bacteriële resistentie bij mensen behorend tot de open bevolking in Nederland? (Hoofdstuk III).
2. Zijn in de open bevolking groepen mensen aanwijsbaar die een bijzonder risico lopen voor het dragerschap van resistente stammen? (Hoofdstuk III en appendix bij hoofdstuk III).
3. Hoe groot is de bacteriële resistentie bij patiënten in het ziekenhuis? (Hoofdstuk IV).
4. Is het probleem in het ziekenhuis met de door ons gebruikte methode van onderzoek te relateren aan het gebruik van antimicrobiële middelen? (Hoofdstuk IV).
5. Krijgen patiënten tijdens opname in het ziekenhuis resistente stammen in de darm? (Appendix bij hoofdstuk IV).
6. Zijn de resistentiepatronen ten opzichte van antimicrobiële middelen van bacteriestammen buiten het ziekenhuis anders dan binnen het ziekenhuis? (Hoofdstuk V).

Hoofdstuk II

Isolatie van bacteriestammen uit faeces en gevoeligheidsbepaling.*

Inleiding.

Voor de definiëring van het resistentieprobleem zijn in dit onderzoek twee bacteriologische technieken gebruikt voor:

1. De isolatie van gevoelige en resistente bacteriestammen uit faeces.
2. De bepaling van de gevoeligheid van bacteriestammen voor een reeks antimicrobiële middelen.

In het eerste deel van dit hoofdstuk wordt toegelicht hoe met behulp van een selectieve kweekmethode een beperkt aantal bacteriesoorten, de aërobe Gram-negatieve staven, uit faeces worden geïsoleerd. Met deze methode kunnen voor een klein aantal antimicrobiële middelen gevoelige en resistente bacteriestammen worden onderscheiden. Het betreft antimicrobiële middelen die vooral in de huisartspraktijk worden gebruikt. Omdat het van belang is ook de gevoeligheid te kennen voor een aantal in ziekenhuizen toegepaste middelen, is gebruik gemaakt van een methode waarmee simultaan de gevoeligheid van een groot aantal bacteriestammen voor een groot aantal middelen kan worden bepaald. Hiertoe is eerst een vergelijkend onderzoek van een aantal beschikbare methoden opgezet. Dit vergelijkend onderzoek vormt het tweede deel van dit hoofdstuk. De motivatie om een gemechaniseerde methode voor ons onderzoek te gebruiken wordt hierin toegelicht.

II.1. Isolatie van gevoelige en resistente bacteriestammen uit faeces.

Van vers geproduceerde faeces werd door de onderzochten met behulp van een steriele wattendrager een monster genomen. In de klinische acqui-

* Dit hoofdstuk is grotendeels gepubliceerd: Degener JE, Thonus IP, Michel MF. The antimicrobial susceptibility test: a comparison of the results of four methods. J Appl Bact 1981; 50: 505-517.

sitie studie, waarbij op de eerste, de vijfde en de tiende opnamedag een monster van patiënten is genomen, werd om praktische redenen een monster genomen uit het rectum. De wattendragers werden in Amies transport medium (Amies 1967) thuis of in het ziekenhuis in de koelkast geplaatst en binnen 24 uur bewerkt. Op het laboratorium werden de wattendragers overgebracht in 10 ml 0,9% NaCl. Van de suspensie werd een verdunningsreeks gemaakt. Standaarddruppels (0,05 ml) van deze verdunningsreeks werden gebracht op MacConkey agar zonder antimicrobieel middel; MacConkey agar met 30 µg/ml tetracycline of 40 µg/ml ampicilline; DST agar (Oxoid) met 0,5% gelyseerde paarde-erythrocyten en 100 µg/ml sulfamethoxazol en Iso-sensitest agar (Oxoid) met 10 µg/ml gentamicine. Na 16 uur bebroeden van de agarplaten bij 37°C werden kolonietellingen verricht van alle voorkomende soorten coliformen afzonderlijk. De ervaring leerde dat verdunningen van 10^{-3} en 10^{-5} van de suspensie voldoende waren om telbare aantallen kolonies te verkrijgen. Van de agarplaat zonder antimicrobieel middel en van de agarplaten met antimicrobiële middelen werd van elke morfologisch te onderscheiden kolonie een subcultuur gemaakt. De in subcultuur gebrachte stam werd vervolgens met een biochemische reeks volgens de methode van Cowan en Steel gedetermineerd (Cowan 1975). Het aantal kolonies van de plaat zonder antimicrobieel middel werd vergeleken met het aantal kolonies op de platen die antimicrobiële middelen bevatten. Op deze wijze kon het percentage resistente stammen ten opzichte van het totaal aantal stammen worden berekend voor elk antimicrobieel middel afzonderlijk en voor alle middelen tegelijk. Omdat de door ons toegepaste methode weinig van die in elders verrichte studies verschilt (Davis e.a. 1970, Guinée e.a. 1970, Datta 1971, Linton e.a. 1972), zijn de door ons verkregen resultaten vergelijkbaar met die van vroegere studies. In onze studie werd volstaan met het onderscheid tussen faecesmonsters zonder resistente stammen, monsters met resistente stammen en monsters met overwegend resistente stammen, dat wil zeggen 50% of meer van de stammen resistent.

Telkens wanneer een nieuwe serie agarplaten met en zonder antimicrobiële middelen was gegoten, werd deze gecontroleerd met de gevoelige standaard-controlestam *E. coli* ATCC 29194 en een resistente *Klebsiella* SK 16913. De *E. coli* stam was gevoelig voor 4 µg/ml ampicilline, 2,5 µg/ml tetracycline, 8 µg/ml sulfamethoxazol en 0,5 µg/ml gentamicine. De overeenkomstige waarden voor de *Klebsiella* stam waren 128, 128, 256 en 16 µg/ml. Deze minimaal remmende concentraties waren vooraf bepaald met een gestandaardiseerde agar dilutiemethode (Barry 1976, Washington e.a.

1980).

Tenslotte werden van de MacConkey agar zonder antimicrobieel middel van alle morfologisch te onderscheiden kolonies telkens drie vrijliggende kolonies op een schuine nutriënt agar gebracht. Van de platen met antimicrobieel middel werd telkens 1 kolonie van alle morfologisch te onderscheiden kolonies op nutriënt agar gebracht. De op nutriënt agar gebrachte stammen werden vervolgens alle gelyofiliseerd. Later konden met deze stammen uitgebreide gevoeligheidsbepalingen worden verricht.

II.2. Bepaling van de gevoeligheid van bacteriestammen voor een reeks antimicrobiële middelen.

Voor het bepalen van de gevoeligheid van bacteriestammen voor een reeks antimicrobiële middelen zijn verschillende technieken gangbaar (Barry 1976, Laverdiere e.a. 1977). Voor een aantal hiervan heeft men op nationaal niveau richtlijnen gegeven voor standaardisatie van de uitvoering en voor de keuze van de breekpunten behorende bij de uitspraak gevoelig, matig gevoelig en resistent (Food and Drug Administration en National Committee for Clinical Laboratory Standards, USA; Werkgroep Richtlijnen Gevoeligheidsbepalingen, Nederland). Ook op internationaal niveau heeft men getracht tot overeenstemming te komen over te gebruiken standaardmethoden (Ericsson e.a. 1971). De toegepaste criteria voor de gevoeligheid van bacteriën kunnen per antibioticum van plaats tot plaats veel verschillen (zie ook tabel II.1.). Tot nu toe hebben de inspanningen om te standaardiseren steeds betrekking gehad op conventionele handwerkmethoden. Voorbeelden hiervan zijn de agar-dilutiemethode en de agar-diffusiemethode. De agar-dilutiemethode is een kwantitatieve methode, waarmee de minimaal remmende concentratie (MRC) van antimicrobiële middelen voor bacteriestammen wordt bepaald. Deze methode is door het gebruik van verdunningsreeksen te bewerkelijk voor het routine-onderzoek. De methode wordt algemeen toegepast als referentiemethode bij de evaluatie van nieuwe technieken. De agar-diffusiemethode is een veel toegepaste conventionele methode, waarmee simultaan voor een groot aantal antimicrobiële middelen de gevoeligheid van een bacteriestam kwalitatief kan worden vastgesteld. De interpretatie van de resultaten met de agar-diffusiemethode is middels regressie-analyse afhankelijk gemaakt van de interpretatie van de resultaten met de agar-dilutiemethode.

Inmiddels zijn gemechaniseerde systemen voor het bepalen van de anti-

Tabel II.1. Criteria voor de gevoeligheid en resistentie van bacteriën, uitgedrukt in MRC en de met de MRC corresponderende remzones.

antimicro- biële stof	MRC (µg/ml)*								zône diam. (mm)		lading schijfje (µg)		
	gevoelig				resistent				FDA/NCCLS*				
	FDA/NCCLS *	**	MS-2	Autobac-1	FDA/NCCLS *	**	MS-2	Autobac-1	gevoelig	resistent	Diffusie- test	MS-2	Autobac-1
ampicilline (Beecham)	< 8	< 1	<10	<16	> 32	> 8	>20	>16	>14	<11	10	2.5	7.5
carbenicilline (Beecham)	<16	<16	<34	<16	> 32	>128	>44	>16	>23	<17	100	16	24
cefalotine (Lilly)	<10	< 1	<18	<16	> 32	> 8	>24	>16	>18	<14	30	10	20
gentamicine (Schering)	< 6	< 1	< 4.8	< 4	> 6	> 4	>11	> 4	>13	<12	10	4	6
kanamycine (Brocades)	< 6	< 4	<10	-	> 25	> 16	>22	-	>18	<13	30	8	-
tobramycine (Lilly)	< 6	< 1	< 4.8	-	> 6	> 4	>11	-	>14	<13	10	4	-
tetracycline (Pfizer)	< 4	< 1	< 6.2	< 4	> 12	> 4	>11.4	> 4	>19	<14	30	5	0.4
clindamycine (Upjohn)	< 1	< 1	< 1.6	< -	> 2	> 4	> 1.8	-	>17	<14	2	1	-
erythromycine (Upjohn)	< 2	< 1	< 3.8	< 4	> 8	> 2	> 5.5	> 4	>18	<13	15	3	0.4
methicilline (Beecham)	< 3	< 4	< 6	< 2	> 3	> 4	>12	> 2	>14	< 9	5	5	7
penicilline G (Specia)	< 0.1	< 0.15	< 1.5	<16	> 0.1	> 0.15	> 1.5	>16	>29	<20	6	1.5	24
cotrimoxazol*** (Roche)	<35	<20	<40	?	>200	> 20	>43	?	>16	<10	25	25	24

Betekenis van de afkortingen:

MRC = minimaal remmende concentratie

FDA = Food and Drug Administration (USA)

NCCLS = National Committee for Clinical Laboratory Standards (USA)

WRG = Werkgroep Richtlijnen Gevoeligheidsbepalingen

* Matsen 1974

** Fabius 1979, Mouton e.a. 1981

*** sulfamethoxazol-trimethoprim in de verhouding 19:1

* waarden tussen gevoelig en resistent worden geïnterpreteerd als matig gevoelig

microbiële gevoeligheid van bacteriestammen commercieel verkrijgbaar (Newsom 1977, Johnston 1979). Een probleem bij de introductie van dergelijke systemen wordt gevormd door verschil in inzicht omtrent de criteria waaraan deze apparatuur moet voldoen. De gemechaniseerde systemen kunnen globaal in twee groepen worden ingedeeld. In de eerste groep wordt gebruik gemaakt van een microdilutie-methode. Hierbij wordt een bacteriestam getest tegen een verdunningsreeks van een antimicrobieel middel (Gavan 1980, Jones 1981). De tweede groep neemt de groeikinetiek van een bacteriestam tegen een concentratie van een antimicrobieel middel als uitgangspunt voor het bepalen van de gevoeligheid (Thornsberry e.a. 1975 en 1980). In beide gevallen kan gebruik worden gemaakt van een optische meettechniek. De waarnemingen kunnen middels een computer worden geïnterpreteerd. Wij zijn in ons laboratorium in de gelegenheid geweest twee apparaten uit de tweede groep, Autobac-1 (Pfizer) en MS-2 (Abbott) te evalueren. Wij hebben de resultaten die met deze apparaten en met de agar-diffusiemethode werden verkregen vergeleken met de resultaten verkregen met de agar-dilutiemethode. In deze studie hebben wij getracht de discrepanties die tussen de methoden werden gevonden te verklaren aan de hand van de gevoeligheidscriteria die in de verschillende systemen besloten liggen. Om praktische redenen werden de experimenten uitgevoerd met twee bacteriesoorten, behorend tot de veel voorkomende potentieel pathogenen. Dit zijn *Escherichia coli*, behorend tot de aërobe Gram-negatieve staven, en *Staphylococcus aureus*, behorend tot de aërobe Gram-positieve cocci. Van beide soorten werd een reeks van elkaar onafhankelijke stammen uit klinische afdelingen verzameld, zodanig dat voor elke soort en elk antimicrobieel middel een ruim gevoeligheidsscala aanwezig was. Om de invloed van de toepassing van verschillende criteria voor gevoeligheid aan te kunnen tonen zijn de resultaten die werden verkregen met de agar-dilutiemethode op twee manieren geïnterpreteerd en wel volgens:

1. criteria van de U.S.A.-Food and Drug Administration (FDA) en de National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (Matsen e.a. 1974, NCCLS 1979).
2. criteria van de Nederlandse Werkgroep Richtlijnen Gevoeligheidsbepalingen (WRG) (Fabius 1979, Mouton e.a. 1981)

Materiaal en methoden.

Bacteriestammen. De collectie van *E. coli* stammen was samengesteld uit de standaard controlestam ATCC 29194 en 54 *E. coli* stammen afkomstig uit de klinische afdelingen van het Academisch Ziekenhuis Rotterdam-Dijkzigt. De collectie stafylococcenstammen bestond uit *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en 32 stammen afkomstig uit de klinische afdelingen van hetzelfde ziekenhuis.

Agar-dilutiemethode. Culturen van 16 uur van de teststammen, bebroed bij 37°C in nutriënt broth, werden met een fotometer bij 600 nm gestandaardiseerd op 10^9 colony forming units (cfu)/ml. Hiervan werd een 10^{-2} verdunning gemaakt in 0,9% NaCl. Met een Steers replicator werd dit inoculum op agarplaten gebracht, waardoor 10^4 - 10^5 cfu per entplaats werden verkregen. De agarplaten (Iso-sensitest-agar, Oxoid) bevatten tweevoudige verdunningen van de antimicrobiële stoffen. Deze werden van de fabrikant verkregen als droge stof met bekende werkzaamheid. De MRC werd gedefinieerd als de minimale concentratie van het middel die totale groeiremming gaf van de te onderzoeken stammen na 18 uur bebroeden bij 37°C. De gevoeligheidsinterpretatie geschiedde volgens FDA/NCCLS en WRG criteria (tabel II.1.).

Agar-diffusiemethode. De diffusietest werd gelijktijdig met de agar-dilutietest uitgevoerd. Bij beide methoden werd uitgegaan van dezelfde 16-uurs cultuur van 10^9 cfu/ml. Van *E. coli* stammen werd de culture 10^{-4} en van *S. aureus* stammen 10^{-3} verdund. Agarplaten (Muller-Hinton agar, Oxoid) werden beënt door bevloeiing met de cel-suspensie. Bijna confluierende groei van kolonies werd bereikt na 16 uur bebroeden bij 35°C. Antimicrobiële stof houdende papierschijfjes (Oxoid) bevatten de concentraties zoals aanbevolen door FDA/NCCLS (Matsen e.a. 1974). Vooraf was vastgesteld dat het inoculum en deze remmingszones met de methode dezelfde waren als met de standaard Kirby-Bauer techniek worden bereikt. De interpretatie van de test kon derhalve gebeuren volgens FDA/NCCLS criteria (tabel II.1.).

Autobac-1. De methode werd gevolgd zoals voorgeschreven door de fabrikant. Dit komt in het kort erop neer dat een fotometrisch gecontroleerd inoculum in gebufferd zout, pH 7,0, wordt toegevoegd aan Eugonic broth (Pfizer Diagnostics). Deze suspensie wordt in een optisch heldere polystyreen cuvet gebracht. In de in 12 compartimenten verdeelde cuvet worden antibiotica houdende schijfjes gedeponeerd met behulp van een dispenser.

Na 3 uur incuberen bij 36°C in een incubator-schudapparaat wordt groei in elk compartiment met antimicrobiële stof met een fotometer automatisch vergeleken met de groei in een controlecompartiment zonder antimicrobiële stof. De gegevens worden met behulp van een microprocessor vertaald in een light scattering index (LSI). De gevoeligheidsinterpretatie wordt afgedrukt middels een printer. De criteria voor gevoeligheid staan vermeld in tabel II.1.

MS-2. De methode werd gevolgd volgens de instructies van de fabrikant. Een optisch heldere cuvet wordt gevuld met een gestandaardiseerd inoculum in sensitest-broth (Oxoid). Deze cuvet bestaat uit twee gedeelten. De Iso-sensitest broth met het inoculum worden gebracht in het bovenste gedeelte. Het onderste gedeelte bestaat uit 11 compartimenten. In 10 compartimenten worden met een dispenser antibiotica houdende schijfjes gebracht. Het elfde compartiment dient als controle. De cuvet wordt bebroeid bij 35°C in een incubator-schudapparaat. Dit apparaat is voorzien van onafhankelijke electro-optische systemen voor elk compartiment afzonderlijk. Als in het bovenste gedeelte van de cuvet logaritmische groei is opgetreden, wordt de broth automatisch verdeeld over de compartimenten met en zonder antimicrobiële stof. Vervolgens wordt met intervallen van 5 minuten de groei in de compartimenten gemeten. De computer is in staat deze gegevens in het geheugen op te slaan en vervolgens te vertalen naar groeicurves. De controle-groeicurve wordt vergeleken met de groeicurves die ontstaan onder invloed van antimicrobiële stof. Het resultaat van deze vergelijking wordt geïnterpreteerd als gevoelig, matig gevoelig en resistent (zie tabel II.1.) en samen met de MRC equivalenten afgedrukt met behulp van een printer.

Definities. De agar-dilutiemethode is met de andere methoden afzonderlijk vergeleken. Discrepancies tussen de agar-dilutiemethode en de andere drie methoden werden als volgt gewaardeerd: zeer ernstig = stam resistent met een agar-dilutiemethode, met de andere methode gevoelig; ernstig = stam gevoelig met een agar-dilutiemethode, met een andere methode resistent; minder ernstig = matig gevoelig met de agar-dilutiemethode en gevoelig of resistent met een andere methode. Het percentage overeenkomst tussen twee methoden werd als volgt gewaardeerd. Goed: > 95%, matig: 85-95%, onvoldoende: < 85%.

Tabel II.2. Verdeling van de MRC waarden van *E. coli* stammen met gevoeligheidsinterpretatie volgens FDA/NCCLS en WRG criteria.

antimicro- biële stof	aantal stammen												Interpretatie			
	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	> 64	128	> 128	S	I	R	WRG
MRC (µg/ml)																
ampicilline	x	-	-	4 (3)	19 (17)	18 (18)	2 (2)	1 (1)	1 (1)	x	2 (-)	8 (5)	41 (38)	2 (2)	12 (7)	- (19)
carbeni- cilline	x	-	1 (1)	11 (10)	22 (20)	7 (7)	2 (2)	1 (1)	1 (1)	x	-	10 (5)	43 (40)	-	12 (7)	2 (5)
cafalotine	-	-	-	3 (3)	17 (14)	17 (15)	10 (9)	6 (5)	2 (1)	-	x	x	37 (32)	10 (9)	8 (6)	37 (32)
gentamicine	35 (32)	15 (12)	5 (3)	-	-	-	-	-	-	-	x	x	55 (47)	-	-	-
kanamycine	-	1	20	26	5	-	1	-	-	2	x	x	52	1	2	2
tobramycine	36	14	4	1	-	-	-	-	-	-	x	x	55	-	-	1
tetracycline	-	1 (1)	32 (27)	9 (8)	2 (2)	-	1 (1)	-	7 (7)	3 (1)	x	x	44 (38)	-	11 (9)	11 (10)
MRC (µg/ml)	0,3	0,6	1,2	2,5	5	10	20	40	80	> 80			S	I	R	I
cotrimoxazol	-	3 (3)	9 (7)	18 (15)	11 (9)	11 (11)	3 (2)	-	-	-	-	-	55 (47)	-	-	-

() = aantallen allen met Autobac-1

x = concentratie niet bepaald

- = geen stammen gevoelig voor deze concentratie

Totaal aantal stammen: 55 (47)

S = gevoelig I = matig gevoelig

R = resistent

Tabel II.3a. *S. coli* stammen. Discrepancies en percentage overeenkomst tussen de agar-diffusiemethode en de agar-dilutiemethode.

antimicro- biële stof	FDA/NCCLS **					WRG *				
	discre- panties				overeenkomst	discre- panties				overeenkomst
	minder ernstig	ernstig	zeer ernstig	totaal		minder ernstig	ernstig	zeer ernstig	totaal	
ampicilline	2	0	0	2	96%	42	0	2	44	24%
carbenicilline	0	0	1	1	98%	1	0	1	2	96%
cefalotine	9	0	3	12	78%	42	0	10	52	5%
gentamicine	0	0	0	0	100%	0	0	0	0	100%
kanamycine	1	1	0	2	96%	1	1	0	2	96%
tobramycine	0	0	0	0	100%	1	0	0	1	98%
tetracycline	2	0	0	2	96%	10	0	0	10	82%
cotrimoxazol	0	1	0	1	98%	0	1	0	1	98%
Totaal	14	2	4	20	98%	97	2	13	112	75%

Aantal stammen: 55; totaal 440 bepalingen

*aantal resistente stammen

**interpretatie van de resultaten volgens FDA/NCCLS criteria

*interpretatie van de resultaten volgens WRG criteria

Tabel II.3b. *E. coli* stammen. Discrepancies en percentage overeenkomst tussen de agar-diffusiemethode en de agar-dilutiemethode.

antimicro- biële stof	FDA/NCCLS **					WRG **				
	discre- panties				overeenkomst	discre- panties				overeenkomst
	minder ernstig	ernstig	zeer ernstig	totaal		minder ernstig	ernstig	zeer ernstig	totaal	
ampicilline	2	13	1	16	66%	39	0	3	42	13%
carbenicilline	0	18	1	19	60%	2	17	2	21	55%
cefalotine	9	11	1	21	55%	32	0	8	40	15%
gentamicine	0	1	0	1	98%	0	1	0	1	98%
tetracycline	0	6	4	10	79%	10	4	4	18	62%
cotrimoxazol	0	5	0	5	89%	0	5	0	5	89%
Totaal	11	54	7	72	74%	82	27	17	126	55%

Aantal stammen: 47; totaal 282 bepalingen

*aantal resistente stammen

**zie voetnoot onder Tabel II.3a

Tabel II.3c. *P. coli* stammen. Discrepancies en percentage overeenkomst tussen de agar-diffusiemethode en de agar-dilutiemethode.

antimicro- biële stof	FDA/NCCLS **					WRG **				
	discre- panties				overeenkomst	discre- panties				overeenkomst
	minder ernstig	ernstig	zeer ernstig	totaal		minder ernstig	ernstig	zeer ernstig	totaal	
ampicilline/ amoxicilline	2	0	1	3	95%	41	0	3	44	20%
carbenicilline	0	0	2	2	96%	2	0	0	2	96%
cefalotine	9	2	5	16	71%	39	0	14	53	4%
gentamicine	0	0	0	0	100%	0	0	0	0	100%
kanamycine	0	2	0	2	96%	0	2	0	2	96%
tobramycine	1	0	0	1	98%	0	0	0	0	100%
tetracycline	1	1	0	2	96%	10	1	0	11	80%
cotrimoxazol	1	0	0	1	98%	1	0	0	1	98%
totaal	14	5	8	27	94%	93	3	17	113	74%

aantal stammen: 55; totaal 440 bepalingen

*aantal resistente stammen

**zie voetnoot onder Tabel II.3a

Resultaten.

E. coli stammen. De verdeling van de gevoeligheid van de *E. coli* stammen, uitgedrukt in MRC, (tabel II.2.) heeft ten opzichte van verschillende antimicrobiële middelen een ander patroon. De gevoeligheidsverdeling voor ampicilline, carbenicilline en tetracycline is bimodaal. De stammen zijn verdeeld over een gevoelige populatie en een zeer ongevoelige populatie (MRC > 64 µg/ml). Gentamicine, tobramycine, cotrimoxazol en cefalotine vertonen een unimodale verdeling met een geleidelijk verloop van gevoelige naar ongevoelige stammen. Verder staat in tabel II.2. de interpretatie vermeld van de MRC-waarden volgens FDA/NCCLS en WRG criteria. Hierbij is te zien dat een verschil in criteria aanleiding geeft tot een verschuiving in de verdeling van gevoelige (S), matig gevoelige (I) en resistente (R) stammen. Als voorbeeld diene dat voor cefalotine 67% van de stammen in de categorie S, 18% in I en 15% in R terecht komt volgens FDA/NCCLS criteria, terwijl dit 0% S, 67% I en 33% R wordt volgens WRG criteria. Vergelijkbare verschuivingen werden gevonden voor ampicilline en tetracycline.

In de tabellen II.3a., b. en c. worden de discrepanties en het percentage overeenkomst tussen de agar-dilutiemethode als referentie methode en de drie andere methoden getoond. Het aantal zeer ernstige discrepanties is vergeleken met het totaal aantal resistente stammen.

Volgens FDA/NCCLS criteria voldoet de agar-diffusietest goed met alle antibiotica behalve met cefalotine (tabel II.3a.). Voor deze stof werd wegens een aantal minder ernstige en zeer ernstige discrepanties een onvoldoende score gevonden. Met WRG criteria was de score met ampicilline, cefalotine en tetracycline onvoldoende, en met de andere stoffen goed. Met cefalotine werden 10 zeer ernstige discrepanties gevonden. Indien in plaats van FDA/NCCLS criteria de WRG criteria werden toegepast, nam het totaal aantal minder ernstige discrepanties toe van 14 naar 97.

Volgens FDA/NCCLS criteria waren de resultaten met Autobac-1 en met gentamicine goed en met cotrimoxazol matig (tabel II.3b.). Alle andere antimicrobiële middelen gaven een onvoldoende score vergeleken met de referentiemethode. Met uitzondering van gentamicine en cotrimoxazol nam het aantal discrepanties bij toepassing van WRG criteria toe. De verdeling van het totaal aantal discrepanties toonde belangrijke verschillen in de categorieën bij toepassing van andere criteria. FDA/NCCLS

Tabel II.4. Verdeling van de MRC waarden van *S. aureus* stammen met gevoeligheidsinterpretatie volgens FDA/NCCLS en WRG criteria.

antimicro- biële stof	aantal stammen															Interpretatie					
																FDA/NCCLS			WRG		
	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	<u>> 32</u>	S	I	R	S	I	R			
MRC (µg/ml)																					
cefalotine	x	x	5 (4)	21 (20)	1 (1)	4 (3)	2 (2)	-	-	-	-	-	33 (30)	-	-	33 (30)	-	-			
clindamycine	1 (niet bepaald met Autobac-1)	16	10	6	-	-	-	-	-	-	-	-	33	-	-	33	-	-			
erythromycine	-	-	-	3 (3)	17 (15)	3 (3)	1 (1)	-	-	1 (1)	5 (5)	3 (2)	24 (22)	-	-	9 (8)	24 (22)	9 (8)			
gentamicine	-	-	-	2 (1)	26 (24)	5 (5)	-	-	-	-	-	-	33 (30)	-	-	33 (30)	-	-			
kanamycine	x	x	-	-	1	1	15	12	2	-	-	2	31	-	2	31	-	2			
methicilline	-	-	-	-	-	-	7 (6)	18 (17)	1 (1)	1 (1)	-	6 (5)	25 (23)	-	-	8 (7)	26 (24)	7 (6)			
penicilline G	5 (4)	10 (10)	2 (2)	-	2 (1)	1 (1)	5 (5)	-	3 (3)	1 (1)	4 (3)	x	17 (16)	-	-	16 (14)	17 (16)	16 (14)			
tetracycline	-	-	-	1 (1)	18 (17)	-	1 (1)	-	-	-	-	13 (11)	20 (19)	-	-	13 (11)	20 (19)	13 (11)			

() = aantallen alleen met Autobac-1

Totaal aantal stammen: 33 (30)

x = concentratie niet bepaald

S = gevoelig I = matig gevoelig

- = geen stammen gevoelig voor deze concentratie

R = resistent

Tabel II.5. *S. aureus* stammen. Discrepancies en percentage overeenkomst tussen de agar-dilutiemethode en de agar-diffusiemethode, Autobac 1 en MS-2, samengevat voor antimicrobiële middelen.*

	FDA/NCCLS		WRG				totaal aantal stammen				
	discre- panties	overeenkomst	discre- panties					overeenkomst			
			minder ernstig	ernstig	zeer ernstig	totaal					
agar-dilutietest en agar-diffusietest	1	0	2	3	99%	1	2	1	4	99%	33
agar-dilutietest en Autobac 1	1	12	5	18	90%	0	13	4	17	91%	30
agar-dilutietest en MS-2	8	0	14	22	92%	8	0	13	21	92%	33

*zie Tabel II.4

criteria laten 15% minder ernstige, 75% ernstige en 10% zeer ernstige discrepanties zien, terwijl WRG criteria 65% minder ernstige, 21% ernstige en 14% zeer ernstige discrepanties tonen. Kanamycine en tobramycine werden niet beproefd met de Autobac-1, omdat deze antibiotica niet beschikbaar waren toen het apparaat werd geëvalueerd.

Volgens FDA/NCCLS criteria was de score met MS-2 goed met alle antimicrobiële middelen behalve met cefalotine (tabel II.3c.). Volgens WRG criteria waren de resultaten met alle antimicrobiële middelen goed met uitzondering van ampicilline, cefalotine en tetracycline. Van de 18 resistente stammen toonden 14 een zeer ernstige discrepantie met cefalotine. Toepassing van andere criteria had een aanzienlijk verschil tussen het aantal ernstige discrepanties tot gevolg. Dit waren er 14 volgens FDA/NCCLS en 93 volgens WRG criteria.

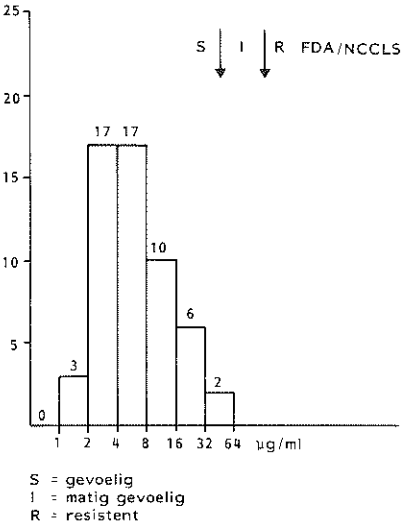
S. aureus stammen. De gevoeligheid van *S. aureus* stammen voor clindamycine en gentamicine is unimodaal verdeeld over gevoelige stammen (tabel II.4.). De gevoeligheid voor erythromycine, methicilline en tetracycline is bimodaal verdeeld over gevoelige stammen en resistente stammen. Verder staan in tabel II.4. de MRC interpretaties volgens FDA/NCCLS en WRG criteria vermeld. Deze twee categorieën van criteria zijn voor stafylococcen vrijwel gelijk.

De resultaten met *S. aureus* stammen en met de agar-dilutiemethode en de drie andere methoden kunnen als volgt worden samengevat. Volgens de FDA/NCCLS en de WRG criteria is de overeenkomst voor alle antimicrobiële middelen samen met de agar-diffusiemethode goed (tabel II.5.). De overeenkomst was matig met Autobac-1 en MS-2. Ernstige en zeer ernstige discrepanties werden gezien met Autobac-1, penicilline en methicilline. Met de MS-2 werden enkele zeer ernstige discrepanties gezien met erythromycine en methicilline.

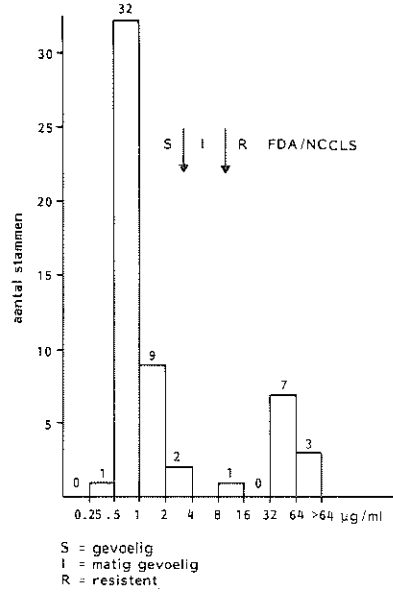
Bespreking.

De agar-diffusiemethode is gerelateerd aan de agar-dilutiemethode (Matsen e.a. 1974, Mouton e.a. 1981). Een goed resultaat is daarom te verwachten met de agar-diffusiemethode en de FDA-NCCLS criteria, die voor deze methode werden vastgesteld. De overeenkomst was voor cefalotine met de *E. coli* stammen echter onvoldoende. Dit slechte resultaat kan als volgt worden uitgelegd. Omdat de verdeling van de MRC van de *E. coli* stammen voor cefalotine continu verloopt over een traject van 2 tot 64 µg/ml, is

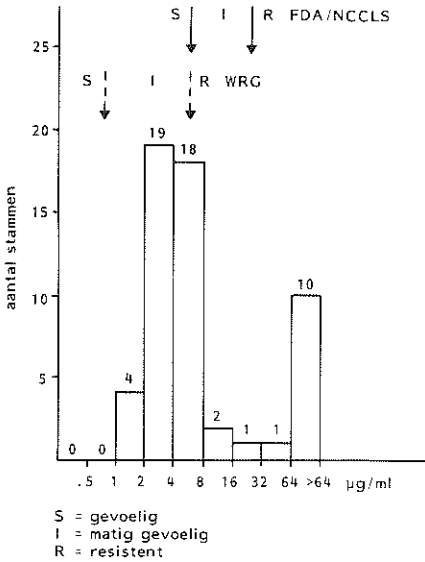
Figuur 11.1a. Verdeling van de MRC van cefalotine voor *E.coli* stammen met FDA/NCCLS gevoeligheidscriteria.



Figuur 11.1b. Verdeling van de MRC van tetracycline voor *E.coli* stammen met FDA/NCCLS gevoeligheidscriteria.



Figuur 11.2. Verdeling van de MRC van ampicilline voor *E.coli* stammen en FDA/NCCLS en WRG gevoeligheidscriteria.



het onmogelijk om een grens te trekken tussen gevoelige en matig gevoelige stammen buiten dit traject (figuur II.1a.). Als de grens van een gevoeligheidscategorie binnen de verdeling van de gevoeligheid van een bacteriepopulatie ligt, geeft een geringe variatie in de methode gemakkelijk aanleiding tot plaatsing van bacteriestammen in een andere categorie. Wanneer de grenzen van de verschillende gevoeligheidscategorieën niet vallen binnen het traject van de gevoeligheid van de meerderheid van de stammen, kan een veel beter resultaat worden verwacht. Dit laatste was het geval met tetracycline, *E. coli* stammen en de criteria volgens FDA/NCCLS (figuur II.1b.). Er dient op te worden gewezen dat dit niet specifiek geldt voor de agar-diffusiemethode, doch eveneens voor alle andere methoden voor de gevoeligheidsbepaling. In feite waren de resultaten met cefalotine bij de drie onderzochte methoden telkens even slecht (78% overeenkomst voor de diffusiemethode, 55% voor Autobac-1 en 73% voor MS-2).

Bij vervanging van de FDA/NCCLS criteria door WRG criteria wordt het percentage overeenkomst beïnvloed door een andere factor. De oorzaak van de lage score die in enkele gevallen met *E. coli* stammen werd gevonden, wordt verduidelijkt aan de hand van fig. II.2. Deze figuur laat dit zien voor ampicilline. De verschuiving van het gevoeligheidscriterium van 8 µg/ml (FDA/NCCLS) naar 1 µg/ml (WRG) veroorzaakt een verschuiving in interpretatie bij 41 stammen. Dit komt goed overeen met de 42 gevonden minder ernstige discrepanties.

Vervanging van FDA/NCCLS criteria door WRG criteria had geen gevolgen voor de onderzochte *S. aureus* stammen. Omdat de MRC waarden voor gevoelige stammen ver onder de gestelde kritische MRC grenzen van gevoeligheid voor beide criteria bleven, kon er geen verschuiving in interpretatie ontstaan.

Het is duidelijk dat de verschuiving in interpretatie op vergelijkbare wijze de drie bepalingsmethoden beïnvloedt. Dit kan worden gezien als de belangrijkste oorzaak van de teleurstellende vermindering van het percentage overeenkomst tussen Autobac-1, MS-2 en de WRG criteria.

Autobac-1 is ontwikkeld volgens de aanbevelingen van de International Collaborative Study (ICS) (Ericsson e.a. 1971). Voor de *E. coli* stammen verschillen de ICS criteria van de FDA/NCCLS en de WRG criteria. Discrepanties konden hierdoor worden verwacht. Zo kan bijvoorbeeld voor ampicilline een verschuiving van de gevoeligheidsgrens van 8 µg/ml met FDA/NCCLS criteria naar 16 µg/ml met ICS criteria voor 18 *E. coli* stammen

consequenties hebben (Fig. II.2). In werkelijkheid werden 16 discrepanties gevonden.

Met Autobac-1 werden echter ook een aantal op deze wijze niet te verklaren discrepanties gevonden. Dit was het geval bij carbenicilline. Zoals aan de hand van de MRC verdeling kon worden verwacht, was het resultaat met *S. aureus* stammen voor alle antimicrobiële middelen goed. Ten opzichte van de meeste antimicrobiële middelen bestond er een duidelijke bimodale verdeling van de gevoeligheid. In de verschillende methoden werden de gevoeligheidsgrenzen geplaatst tussen de gevoelige en de resistente bacteriepopulaties. Dit had een hoge mate van overeenkomst tussen de resultaten van de verschillende methoden tot gevolg. Er waren technisch problemen met het bepalen van de gevoeligheid voor methicilline van stafylococci. Dit was ook in andere studies het geval (Cleary e.a. 1978, Carlson e.a. 1982).

De criteria die zijn gebruikt bij de ontwikkeling van de MS-2 komen veel overeen met de FDA/NCCLS criteria. Een goed resultaat was daarom met deze criteria te verwachten en dit werd ook gevonden. De reden, waarom de score met cefalotine en *E. coli* stammen onvoldoende was, is reeds besproken bij de agar-diffusiemethode.

Uit deze studie blijkt dat het gebruik van verschillende criteria aanleiding kan geven tot ernstige discrepanties bij de interpretatie van de resultaten. De beslissing omtrent criteria voor gevoeligheidsinterpretatie kan van land tot land verschillen en komt min of meer arbitrair tot stand. De interpretatie gevoelig, matig gevoelig of resistent is in de in-vivo situatie problematisch. De breekpunten tussen deze categorieën houden verband met de gewenste of toelaatbare concentraties van antimicrobiële middelen in bloed en weefsels. Dit laatste is weer afhankelijk van de wijze van dosering. De criteria zijn vaak gekozen met een veiligheidsmarge tussen de concentratie in-vivo en de MRC van de bacteriestammen in-vitro. Voor agar-diffusiebepalingen is dit probleem eenvoudig op te lossen met behulp van regressie-analyse. Verschillen in criteria kunnen met de regressieformule vertaald worden in kritische remmingszones. De semi-automatische apparatuur, die in deze studie werd onderzocht, is gestandaardiseerd volgens criteria die nauw aansluiten bij de FDA/NCCLS criteria. Aanpassing van de apparatuur aan andere criteria is praktisch niet mogelijk. Gebruikers van dergelijke apparatuur moeten daarom rekening houden met ernstige discrepanties bij de interpretatie van de resultaten, wanneer hun criteria verschillen van de criteria van de apparatuur. Uit

deze studie is gebleken dat gebruik van het MS-2 apparaat tot goede resultaten leidt, wanneer men de FDA/NCCLS criteria accepteert. Deze gunstige resultaten zijn ook door anderen gevonden (Barnes 1980, Thornsberry 1980).

De FDA/NCCLS criteria zijn in het algemeen hoger afgesteld dan de WRG criteria (zie tabel II.1.). De FDA/NCCLS criteria komen daardoor tegemoet aan de reeds in 1964 voorgestelde wens van Bauer om de grenzen van klinische gevoeligheid en resistentie, zoveel als geoorloofd is, te vergelijken naar de grenzen van natuurlijke gevoeligheid en resistentie van bacteriepopulaties (Bauer 1964). De door de WRG aanbevolen lage grenzen, voor met name ampicilline en cefalotine, zijn inmiddels op een hoger niveau bijgesteld (Mouton e.a. 1981). Zij zijn nog steeds aanzienlijk lager dan de FDA/NCCLS normen. Met toepassing van de FDA/NCCLS criteria kon voor het doel van deze studie het MS-2 apparaat goed worden gebruikt, omdat met deze methode inzicht wordt verschaft in het voorkomen van resistentie tegen hoge concentraties van een reeks antimicrobiële middelen. Dit onderzoek is verricht met *E. coli* stammen die werden verzameld in de open bevolking en bij patiënten in het ziekenhuis. De resultaten van dit onderzoek worden beschreven in hoofdstuk V.

Het dragerschap van aërobe Gram-negatieve staven en resistentie van *Escherichia coli* voor antimicrobiële middelen buiten het ziekenhuis.*

Inleiding.

De darm vormt de normale verblijfplaats van de aërobe Gram-negatieve flora. Zij vormt een belangrijke bron, van waaruit onder bepaalde omstandigheden infecties met deze flora kunnen ontstaan. In de huisartspraktijk zijn dit voornamelijk infecties van de lagere urinewegen. In het ziekenhuis worden ook wondinfecties en luchtweginfecties, eventueel gepaard gaande met sepsis, door Gram-negatieve bacteriën veroorzaakt. Wanneer in de darm een reservoir ontstaat van resistente bacteriestammen, kan dit tot gevolg hebben dat dergelijke stammen bij infectie een rol gaan spelen (Brumfitt e.a. 1971, Grüneberg e.a. 1976, E.M. Cooke e.a. 1979, 1980). Het resistentieprobleem is in het ziekenhuis een bron van voortdurende zorg en een bedreiging voor de bruikbaarheid van antimicrobiële middelen. Weinig is bekend over de prevalentie van resistente stammen onder de bevolking. Door middel van een breed opgezet epidemiologisch faecesonderzoek onder twee groepen in een open bevolking in Nederland, is getracht de omvang te bepalen van het resistentieprobleem van de faecale flora. De uitkomsten van deze studie kunnen worden gebruikt bij onderzoek naar wijzigingen in de omvang van de resistentie in relatie tot de omvang en aard van het gebruik van antimicrobiële middelen.

*De inhoud van dit hoofdstuk is grotendeels gepubliceerd:

1. Degener JE, Smit ACW, Michel MF, Valkenburg HA, Muller L. Gevoeligheid van Gram-negatieve aërobe darmflora voor tetracycline, ampicilline, sulfamethoxazol en gentamicine in een open bevolking in Nederland. Ned T Geneesk 1982; 126: 277-280.
2. Degener JE, Smit ACW, Michel MF, Valkenburg HA, Muller L. Carriage of aerobic Gram-negative bacilli and drug resistance of *Escherichia coli* in different age-groups in Dutch urban communities. J Med Microbiol 1983; 16: 139-145.

Materiaal en methoden.

De populatie. Het onderzoek maakte deel uit van het epidemiologisch preventief onderzoek te Zoetermeer (EPOZ) (Hofman e.a. 1980). Tussen 1975 en 1978 werden in twee wijken 13.500 bewoners uitgenodigd om in het EPOZ te participeren. Er waren 10.500 respondenten (78%), behorend tot 4.600 huishoudens. Hieruit werd door ons een aselekt gelaagde steekproef getrokken. Per huishouden werd telkens één persoon getrokken. Dit leverde 917 personen op, verdeeld in ongeveer gelijke aantallen over drie leeftijdsgroepen van kinderen van 6-17 jaar, jonge volwassenen van 18-49 jaar en mensen van 50 jaar en ouder. Aan de aan deze wijken verbonden huisartsen werd informatie verstrekt over het onderzoek. Aan de bevolking werd een schriftelijke uitnodiging gestuurd, waarin doel en methode van het onderzoek werden uiteengezet. In de uitnodiging werd meegedeeld wanneer één van ons een huisbezoek zou komen brengen. Tijdens het huisbezoek werd aan de respondent gevraagd naar: 1. het gebruik van antimicrobiële middelen binnen een periode van 30 dagen voorafgaand aan het tijdstip van onderzoek; 2. ontslag uit een ziekenhuis binnen een periode van drie maanden voorafgaand aan het tijdstip van onderzoek en 3. contact met de veehouderij. Een wattendrager met Amies' medium en een geschreven instructie voor gebruik werden bij de respondent achtergelaten. De respondent nam zelf een monster van vers geproduceerde faeces. Tenslotte werd een afspraak gemaakt om bij een tweede huisbezoek het faecesmonster af te halen. Het onderzoek in Zoetermeer vond plaats in een periode van 26 maanden, tussen september 1978 en november 1980.

Omdat kinderen jonger dan 6 jaar in de Zoetermeer-studie niet konden worden onderzocht, werd een aanvullende studie verricht bij bezoekers van een consultatiebureau voor zuigelingen en kleuters. Dit consultatiebureau bevindt zich in Overschie. Overschie heeft een met Zoetermeer vergelijkbare randstad bevolking en ligt ongeveer 10 km van de plaats van het eerste onderzoek. Aan 117 moeders, die opeenvolgend met hun kind het consultatiebureau bezochten, werd tussen april en november 1980 gevraagd of bij de kinderen faecesonderzoek mocht worden verricht. Alle onder-vraagden verleenden medewerking. Met een instructie kregen zij een wattendrager en Amies medium mee naar huis. Het faecesmonster moest bij het consultatiebureau worden ingeleverd. Moeders en hun kinderen die een consultatiebureau bezoeken zijn representatief voor moeders en kinderen van dezelfde leeftijd uit de open bevolking. In Nederland worden 97% van

Tabel III.1. Aërobe Gram-negatieve staven geïsoleerd uit faecesmonsters bij respondenten uit vijf leeftijdsgroepen.

Faecesmonsters	leeftijd (jaren)					totaal
	< 1	1-5	6-17	18-49	50-80	
Totaal aantal monsters*	64	53	193	221	210	741
aërobe gram-negatieven	61 (95)	50 (94)	181 (94)	207 (94)	196 (93)	695 (94)
<i>Escherichia coli</i>	57 (89)	46 (87)	178 (92)	205 (93)	194 (92)	680 (92)
<i>Klebsiella</i>	46 (72)	16 (30)	23 (12)	18 (8)	26 (12)	129 (17)
<i>Enterobacter</i>	15 (23)	9 (17)	17 (9)	12 (5)	13 (6)	66 (9)
<i>Proteus mirabilis</i>	1 (2)	0	0	2 (1)	3 (1)	6 (1)
<i>Proteus indol</i> positief	3 (5)	1 (2)	0	0	0	4 (1)
<i>Pseudomonas</i>	0	0	3 (2)	4 (2)	6 (3)	13 (2)

* dit komt overeen met het totaal aantal respondenten.

de zuigelingen en 93% van de oudere kinderen op een consultatiebureau gezien (Centraal bureau voor de statistiek 1981).

Faecesmonsters. Faecesmonsters werden getransporteerd en bewerkt volgens de in hoofdstuk II onder II.1. beschreven methode. Agarplaten met tetracycline en ampicilline werden voor het onderzoek naar het voorkomen van resistente stammen gebruikt voor alle monsters. Door problemen met de kwaliteit van de sulfamethoxazol bevattende agarplaat, werd deze pas in de derde onderzoeksmaand in Zoetermeer geïntroduceerd. Omdat wij later een sterke stijging constateerden van het aantal gentamicine resistente *Enterobacteriaceae* en *Pseudomonas* in klinisch onderzoeksmateriaal in het Dijkzigt Ziekenhuis, hebben wij in de 10^e onderzoeksmaand in Zoetermeer de gentamicine bevattende agarplaat ingevoerd. Dit heeft ertoe geleid dat 83% van de monsters van respondenten van 6-80 jaar werden onderzocht op het voorkomen van sulfamethoxazol resistente stammen en 26% op het voorkomen van gentamicine resistente stammen. Alle monsters van de kinderen jonger dan 6 jaar werden met de vier antimicrobiële middelen onderzocht.

Statistische bewerking. Om een relatie aan te tonen tussen de vijf leeftijdsgroepen en de prevalentie van de verschillende bacteriesoorten en resistente *E. coli* is de χ^2 -toets met vier vrijheidsgraden toegepast. Voor het dragerschap van resistente stammen bij risicogroepen ten opzichte van de overige bevolking werd het relatieve risico en de bijbehorende p-waarde berekend (Rothman e.a. 1979).

Resultaten.

Respons. Op het consultatiebureau werden van 64 kinderen jonger dan 1 jaar (zuigelingen) en van 53 kinderen van 1-5 jaar monsters verzameld. Van de zuigelingen waren er 41 (64%) in het ziekenhuis geboren, 15 (23%) waren direct na de bevalling naar huis gegaan, de overige acht (13%) waren thuis geboren. Vier zuigelingen kregen ten tijde van het onderzoek nog borstvoeding. Van de 917 mensen van 6 jaar en ouder, die in Zoetermeer een uitnodiging hadden gekregen om aan het onderzoek mee te werken, waren er inmiddels 114 verhuisd of overleden voor het begin van de studie. Van de overige 803 weigerden 179 (22%) medewerking. De respons was respectievelijk 81%, 74% en 79% in de leeftijdsgroepen van 6-17, 18-49 en 50-80 jaar. Tenslotte konden 624 personen, van de leeftijd van 6 jaar en ouder, worden onderzocht. Deze waren bij benadering gelijkmatig verdeeld over de drie leeftijdsgroepen (tabel III.1.) Van deze respon-

Tabel III.2. Resistente *E. coli* in *E. coli* bevattende faecesmonsters in vijf leef-tijdsgroepen.

Faecesmonsters	leeftijd (jaren)					totaal
	< 1	1-5	6-17	18-49	50-80	
Aantal monsters met <i>E. coli</i>	57	46	178	205	194	680
Onderzoek met sulfamethoxazol	57	46	156	181	154	594
<i>E. coli</i> resistent voor:						
tetracycline	19 (33)	26 (57)	76 (43)	90 (44)	74 (38)	285 (42)
ampicilline	18 (32)	17 (37)	42 (24)	49 (24)	51 (26)	177 (26)
sulfamethoxazol	29 (51)	26 (57)	79 (51)	86 (48)	56 (36)	276 (46)
één of meer van deze drie middelen	40 (70)	34 (74)	106 (68)	116 (64)	96 (62)	392 (66)

() = %

Voor tetracycline en ampicilline is het resistentiepercentage berekend over het totaal-aantal *E. coli* bevattende monsters. Voor sulfamethoxazol en "één of meer van deze anti-microbiële middelen" is het resistentiepercentage berekend over de monsters die op sul-famethoxazol resistente *E. coli* werden onderzocht.

Tabel III.3. Overwegend resistente *E. coli** in *E. coli* bevattende faecesmonsters in vijf leeftijdsgroepen.

Faecesmonsters	leeftijd (jaren)					totaal
	< 1	1-5	6-17	18-49	50-80	
aantal met <i>E. coli</i>	57	46	178	205	194	680
onderzocht met sulfamethoxazol	57	46	156	181	154	594
<i>E. coli</i> overwegend resistent						
voor: tetracycline	6 (11)	10 (22)	22 (12)	24 (12)	21 (11)	83 (12)
ampicilline	10 (18)	4 (7)	8 (4)	9 (4)	11 (6)	42 (6)
sulfamethoxazol	9 (16)	14 (30)	30 (19)	36 (20)	27 (18)	116 (20)
één of meer van deze drie middelen	18 (32)	22 (48)	37 (24)	48 (27)	36 (23)	161 (27)

() = %

* \geq 50% van de *E. coli* stammen resistent

Percentage berekend volgens de voetnoot onder Tabel III.2.

denten hadden 23 (4%) een antimicrobieel middel gebruikt in de 30 dagen voorafgaand aan het onderzoek. Elf (2%) hadden contact met het veebedrijf en negen waren in de voorafgaande drie maanden ontslagen uit een ziekenhuis.

Verdeling van aërobe Gram-negatieve staven in faecesmonsters. In de vijf leeftijdsgroepen werd *E. coli* in 87-93% van de monsters gevonden (tabel III.1.). *Klebsiella* en *Enterobacter* werden vaker gevonden in monsters van kinderen jonger dan 6 jaar dan in de oudere leeftijdsgroepen ($p < 0,001$). *Klebsiella* werd bij acht van 12 kinderen met borstvoeding gevonden (67%). Dit waren de vier eerder genoemde kinderen en acht toegevoegde kinderen die niet in het oorspronkelijke onderzoek voorkwamen. Dit percentage van 67 is gelijk aan dat van alle kinderen (72%).

Prevalentie van resistente E. coli. De berekeningen van de prevalentie van resistente *E. coli* zijn uitsluitend gemaakt voor het aantal *E. coli* bevattende faecesmonsters. De resultaten hebben daarom alleen betrekking op personen met *E. coli* in faeces (87-93%). Er werd geen relatie gevonden tussen geslacht of leeftijdsgroep en het dragerschap van resistente *E. coli*. De prevalentie van resistente *E. coli* van de onderzochten uit alle leeftijdsgroepen samen bedroeg 42% voor tetracycline, 26% voor ampicilline en 46% voor sulfamethoxazol (tabel III.2.). De prevalentie van *E. coli*, resistent voor één of meer van deze middelen, bedroeg 66%. Gentamicine-resistentie werd in dit onderzoek niet gevonden.

Prevalentie van het voorkomen van overwegend resistente E. coli in faeces. Faecesmonsters waarvan de kolonietellingen van *E. coli* op een agarplaat met antimicrobiële stof tenminste 50% bedroegen van de tellingen op de agar zonder antimicrobiële stof zijn op dezelfde wijze geteld (tabel III.3.). Er werden geen verschillen in het dragerschap van overwegend resistente *E. coli* in faeces gevonden tussen de vijf leeftijdsgroepen voor tetracycline en sulfamethoxazol. Het dragerschap van overwegend resistente *E. coli*, resistent voor ampicilline kwam vaker voor bij zuigelingen (18%) dan in de oudere leeftijdsgroepen (4-7%; $p < 0,01$). De prevalentie van een overwegende *E. coli* flora, resistent voor één of meer van deze middelen bedroeg 27%.

Prevalentie van resistente E. coli in groepen met een verhoogd risico. Uit de gegevens die worden getoond in tabel III.4. blijkt dat voor tetracycline en sulfamethoxazol resistente *E. coli* significant vaker gevonden worden bij respondenten die recent een antimicrobieel middel hadden gebruikt en die contact hadden met de veehouderij. Het betreft

Tabel III.4. *Resistente E. coli in E. coli bevattende faecesmonsters bij risico-groepen*

Faecesmonsters	risico-groep		overige	RR	X	P
	gebruikers van antimicrobiële middelen	contact met veehouderij	bevolking			
Aantal met <i>E. coli</i>	19	11	547			
Onderzocht met sulfamethoxazol	15	11	465			
<i>E. coli</i> resistent voor:						
tetracycline	12 (63)	9 (82)	219 (40)	1,75	2,65	0,004
ampicilline	3 (16)	5 (45)	134 (24)	1,13	0,26	> 0,05
sulfamethoxazol	11 (73)	6 (55)	204 (44)	1,48	2,12	0,02

RR = relatieve risico

() = %

Percentage berekend overeenkomstig de voetnoot onder Tabel III.2.

hier de bevolking van 6 jaar en ouder. In slechts vier monsters van de negen respondenten die kort tevoren uit een ziekenhuis waren ontslagen werd *E. coli* gevonden. Deze getallen zijn niet opgenomen in de tabel.

Discussie.

De door ons toegepaste techniek is vergelijkbaar met methoden die in een aantal elders verrichte studies werden toegepast. Deze studies staan samengevat in tabel I., hoofdstuk I. Onze resultaten in de stedelijke bevolking komen het meest overeen met Linton's bevinding bij een agrarische bevolking. Omdat in ons onderzoek de coliformen werden gedifferentieerd, hebben wij kunnen vaststellen dat *Klebsiella* en *Enterobacter* veel voorkomen bij jonge kinderen. De prevalentie van resistentie is berekend over de personen met *E. coli* in faeces. Omdat dit 92% betrof van alle respondenten mag worden verondersteld dat deze gegevens representatief zijn voor de bevolking.

Het is niet duidelijk welke factoren verantwoordelijk zijn voor het door ons gesignaleerde resistentieprobleem. Grootschalig gebruik van antibiotica in de veehouderij heeft geleid tot multiple resistentie bij vee (Anderson 1965, Williams-Smith 1968). Bacteriële resistentie bij het vee kan gemakkelijk overgaan op de mens (Levy e.a., 1976). Ook vindt overdracht van resistente stammen van mens op mens plaats (Petrocheilou e.a., 1977). Andere besmettingsbronnen worden gevormd door faecaal besmet oppervlaktewater (Guinée e.a. 1974B) en faecaal besmet voedsel (Shooter e.a. 1971; Casewell e.a. 1978, Cooke e.a. 1979). Tenslotte kan ook antibioticumgebruik in de huisartspraktijk bijdragen aan het dragerschap van resistente stammen (Richmond e.a. 1980). In de periode van ons onderzoek werden door huisartsen van 33.460 ziekenfondspatiënten gedurende een jaar in Zoetermeer 18.000 antibioticumrecepten voorgeschreven. Voor 20% betrof het tetracyclines. Uitgaande van de excretie van tetracycline-resistente stammen gedurende een arbitraire periode van twee weken per behandeling betekent dit dat gedurende 50.400 patiëntdagen per jaar excretie plaatsvindt. Per dag zijn dit 138 patiënten. Dit is 0,4% van de bevolking en een percentage dat ruim beneden de door ons gevonden 42% dragers van tetracycline-resistente stammen ligt. Het medisch gebruik van antimicrobiële middelen en het geringe aantal directe contacten met de veehouderij in ons onderzoek kunnen niet de enige verklaring zijn voor de hoge prevalentie van resistente stammen. Het is uit dit onderzoek niet

duidelijk wat de oorzaak is van het voorkomen van resistente stammen in de open bevolking.

Het voorkomen van een overwegend resistente *E. coli* flora in de darm is van betekenis wanneer een infectie met darmflora ontstaat. In de praktijk buiten het ziekenhuis zijn dit vooral urineweginfecties. Bij een pre-existente resistente *E. coli* flora in de darm, wordt meestal ook een resistente verwekker van de urineweginfectie gevonden (Lincoln e.a. 1970, Brumfitt e.a. 1971, Grüneberg e.a. 1976).

Opmerkelijk is de hoge prevalentie van het dragerschap van een overwegend ampicilline-resistente flora bij zeer jonge kinderen. In deze groep zijn ook van nature meer resistente soorten, zoals *Klebsiella*, meer prevalent. Feeney vond dat bij kinderen met flesvoeding resistente flora en *Klebsiella* frequenter voorkomt dan bij kinderen met borstvoeding (Feeney e.a. 1980). Wij hebben in een klein na-onderzoek deze waarneming niet kunnen bevestigen.

Omdat in dit onderzoek geen verklaring kan worden gegeven voor het voorkomen van resistente stammen bij een groot aantal respondenten, terwijl bij anderen geen resistente stammen zijn gevonden, is besloten een na-onderzoek te verrichten. In dit na-onderzoek hebben wij aangenomen dat een groter aantal risico-factoren in het milieu aanwezig is dan in het hiervoor beschreven onderzoek werd verondersteld. Aan de respondenten is middels een enquête voorgelegd of deze risico-factoren van toepassing zijn. De resultaten van dit na-onderzoek worden gepresenteerd in de appendix.

Case control onderzoek naar risico-factoren voor het dragerschap van overwegend resistente *Escherichia coli* flora in feces.

Bij het hiervoor beschreven onderzoek is een risicogroep gedefinieerd, bij wie een hogere prevalentie van resistente *E. coli* kon worden verwacht dan bij de rest van de open bevolking. Deze verwachting was juist (tabel III.4.). Desondanks werden bij de overige respondenten *E. coli* stammen gevonden die in niet minder dan 40% resistent waren voor tetracycline, in 24% voor ampicilline en in 44% voor sulfamethoxazol (tabel III.4.). Omdat bij deze respondenten geen oorzaak kon worden vastgesteld voor de gevonden resistentie, is een case control studie verricht. Wij zijn teruggegaan naar de oorspronkelijke onderzoeksgroep met een meer gedetailleerde vragenlijst. De in deze retrospectieve studie gestelde vragen hadden tot doel nog onbekende risico-factoren voor de acquisitie van resistente *E. coli* flora op te sporen.

Materiaal en methoden.

Het oorspronkelijke onderzoek omvatte 491 respondenten van 6 jaar en ouder, bij wie faecesmonsters met *E. coli* werden onderzocht met tetracycline, ampicilline en sulfamethoxazol (zie voetnoot tabel III.2.). In deze monsters werden bij 173 respondenten uitsluitend gevoelige stammen en bij 121 overwegend resistente stammen gevonden (tabel III.5.). In dit case control onderzoek vormde de laatste groep de "cases" en de eerste groep de "controls". Zowel aan de "cases" als aan de "controls" werd een formulier gezonden met 22 vragen over dieet, werk en milieu, en gezinsamenstelling. De inhoud van dit formulier is weergegeven in tabel III.6a. Aan de huisartsen van de respondenten werd gevraagd of in een periode van één jaar voorafgaand aan het oorspronkelijke onderzoek, antimicrobiële middelen waren voorgeschreven aan de respondenten of hun gezinsleden. De enquête bij de huisartsen werd uitgevoerd met toestemming van de betrokken respondenten. Een maand na de enquête werd aan diegenen, die nog niet hadden geantwoord, een rappel gestuurd.

Tabel III.5. *Respons case control studie in een bevolkingsgroep met gevoelige E. coli en een bevolkingsgroep met overwegend resistente E. coli in faeces.*

Bevolking	gevoelige <i>E. coli</i>	overwegend resistente <i>E. coli</i>
totaal		
geënquêteerd	173	121
onbestelbaar	<u>9</u>	<u>2</u>
bestand	164 (100)	119 (100)
eerste respons	104 (63)	91 (76)
respons na rappel	25 (15)	21 (18)
totaal respons	129 (79)	112 (94)
() = %		

Voor respondenten met resistente stammen is per positief beantwoorde vraag het relatieve risico voor het dragerschap van resistente stammen berekend ten opzichte van respondenten met gevoelige stammen die op de betreffende vraag eveneens positief antwoordden (Rothman 1979). Verder werd de bijbehorende p-waarde berekend.

Resultaten.

Na verzending van een rappel bedroeg de respons op het vragenformulier 79% in de groep respondenten met uitsluitend gevoelige *E. coli* (tabel III.5.) en 94% in de groep met overwegend resistente *E. coli*. Tabel III.6a. en III.6b. tonen de gestelde vragen en de wijze waarop werd geantwoord. Op slechts één van de 22 gestelde vragen werd er tussen de twee groepen een verschillend antwoord gegeven. In de groep met overwegend resistente *E. coli* flora antwoordden minder personen dat gebruik gemaakt werd van gesteriliseerde melk dan in de groep zonder resistente *E. coli* ($p < 0,05$). Er werd geen verschil gevonden in de opgave van door de huisartsen voorgeschreven antimicrobiële middelen (tabel III.7.). In tabel III.7. is tevens te zien hoe de huisartsen hebben geantwoord. Over 96 van de 241 respondenten kon geen informatie meer worden verkregen. In het merendeel van de gevallen werd dit veroorzaakt doordat de betrokken huisartsen niet reageerden op ons verzoek.

Discussie.

In het ons omringende milieu worden veelvuldig resistente bacteriestammen aangetroffen. Bij het vee, met name wanneer het met antimicrobiële middelen gesupplementeerd voedsel krijgt, worden vaak en in hoge dichtheid resistente stammen in faeces gevonden (Mercer e.a. 1971, Burton e.a. 1974, Guinée e.a. 1974A, Siegel e.a. 1974, Hartley e.a. 1975, Levy e.a. 1976, Ahart e.a. 1978). Bij kleine huisdieren, zoals honden, is de frequentie van dragerschap van resistente stammen hoog (Hirsch e.a. 1980). Bij honden afkomstig van het platteland, worden vaker resistente stammen aangetroffen dan bij honden uit een stedelijk milieu (Monaghan e.a. 1981). De bij het vee voorkomende resistente stammen zijn terug te vinden bij hun verzorgers (Levy e.a. 1976). Er zijn aanwijzingen dat de verspreiding van resistente stammen uit het dierlijk reservoir door

Tabel III.6a. Vragen* aan respondenten in de case control studie.

vraag no.**

dieet

1. Eet u iedere week tartaar/filet americain
2. Eet u iedere week rauwkost
3. Drinkt u iedere week melk
4. Zo ja, gepasteuriseerd***
5. Gesteriliseerd***
6. Vers van de koe***
7. Hoe vaak eet u in een restaurant of cafetaria: iedere week
8. iedere maand
9. minder dan 1 x per maand

beroep en omgeving

10. Komt u in uw dagelijks werk vaak in contact met levensmiddelen: in Horeca
11. in fabriek
12. Werkt u in een agrarisch bedrijf, met vee of van vee afkomstige producten (zuivel, mest)
13. Zijn er in uw gezin personen die één van de vragen onder 10, 11 of 12 met ja kunnen beantwoorden
14. Werkt u in een ziekenhuis of ander verzorgingsinstituut
15. Zo ja, heeft u nauw contact met patiënten
16. Werkt iemand in uw gezin in een ziekenhuis of verzorgingsinstituut
17. Zo ja, is er nauw contact met patiënten
18. Heeft u een gezin met kinderen jonger dan 6 jaar
19. Heeft u kinderen ouder dan 5 jaar
20. Maken de laatsten iedere week gebruik van de snackbar/kar op school of op straat
21. Heeft u een hond of een kat
22. Zwemt u, b.v. in uw vakantie, in open oppervlaktewater

* te beantwoorden met ja of nee

** nummering correspondeert met de antwoorden in Tabel III.6b.

*** voor vraag 4, 5 en 6 zijn meer antwoorden mogelijk.

Tabel III.6b. Antwoorden op de vragen aan respondenten in de case control studie.

vraag no.*	gevoelige <i>E. coli</i> (n=129)		> 50% resistente <i>E. coli</i> (n=112)		RR	χ
	<u>ja</u>	<u>neen</u>	<u>ja</u>	<u>neen</u>		
1.	11 (9)	118 (92)	10 (9)	102 (91)	1.0	0.11
2.	72 (56)	57 (44)	61 (55)	51 (46)	1.0	-0.21
3.	113 (88)	16 (12)	93 (83)	19 (17)	0.8	-1.00
4.	77 (60)	52 (40)	72 (64)	40 (36)	1.1	0.74
5.	41 (32)	88 (68)	22 (20)	90 (80)	0.7	-2.15**
6.	9 (7)	120 (93)	6 (5)	106 (95)	0.7	-0.53
7.	8 (6)	121 (94)	6 (5)	106 (95)	0.9	-0.27
8.	14 (11)	115 (89)	16 (14)	96 (86)	1.2	0.81
9.	76 (59)	53 (41)	72 (65)	40 (35)	1.1	0.87
10.	4 (3)	125 (97)	2 (2)	110 (98)	0.4	-0.72
11.	4 (3)	125 (97)	1 (1)	111 (99)	0.2	-1.18
12.	5 (4)	124 (96)	5 (5)	107 (96)	1.1	0.27
13.	16 (12)	113 (88)	20 (18)	92 (82)	1.1	1.18
14.	4 (3)	125 (97)	7 (6)	105 (94)	1.4	1.19
15.	3 (2)	126 (98)	5 (5)	107 (96)	1.4	1.39
16.	10 (8)	119 (92)	9 (8)	103 (92)	1.0	0.10
17.	8 (6)	121 (94)	7 (6)	105 (94)	1.0	0.53
18.	8 (6)	121 (94)	8 (7)	104 (93)	1.1	0.32
19.	57 (44)	72 (56)	48 (43)	64 (57)	1.0	0.18
20.	10 (8)	119 (92)	7 (6)	105 (94)	0.9	-0.45
21.	45 (35)	84 (65)	44 (39)	68 (61)	1.1	0.73
22.	47 (36)	82 (64)	52 (46)	60 (54)	1.3	1.58

() = %

* nummering correspondeert met de vragen in Tabel III.6a.

** no. 5 is significant verschillend.

RR = relatieve risico

Tabel III.7. *Enquête bij huisartsen over gebruik van antimicrobiële middelen door respondenten en hun gezinsleden.*

	gevoelige <i>E. coli</i> (n=129)	> 50% resistente <i>E. coli</i> (n=112)
gebruik niet gedo- cumenteed	10	11
geen respons	37	38
totaal	47	49
geen gebruik	70 (85)	51 (81)
gebruik breedspectrum penicilline	10 (12)	7 (11)
overig gebruik	2 (2)	5 (8)
Totaal	82 (100)	63 (100)

() = %

slachtproducten aanzienlijk is (Howe e.a. 1976, Linton e.a. 1977B). Besmetting van de mens kan plaatsvinden via voedselproducten van dierlijke herkomst en door de wijze waarop dit voedsel wordt bereid (Cooke e.a. 1971, Linton 1977A, Shooter e.a. 1977). Uit de aanwezigheid van een groot dierlijk reservoir, is vermoedelijk de besmetting met resistente stammen van oppervlaktewater te verklaren (Sturtevant e.a. 1969, Cooke 1976). Experimenteel heeft men kunnen aantonen dat gebruik van antimicrobiële middelen bij mensen aanleiding kan geven tot kolonisatie met resistente bacteriestammen afkomstig van rundvee (Burton e.a. 1974).

Resistentie is vooral in ziekenhuizen een probleem. Het ziekenhuis-milieu draagt bij tot kolonisatie met resistente stammen van patiënten en hun gezonde gezinsleden (Damato e.a. 1974). De verschillende wegen waarlangs resistente stammen zich zouden kunnen bewegen in het milieu zijn weergegeven in de figuur (zie ook Linton 1977A).

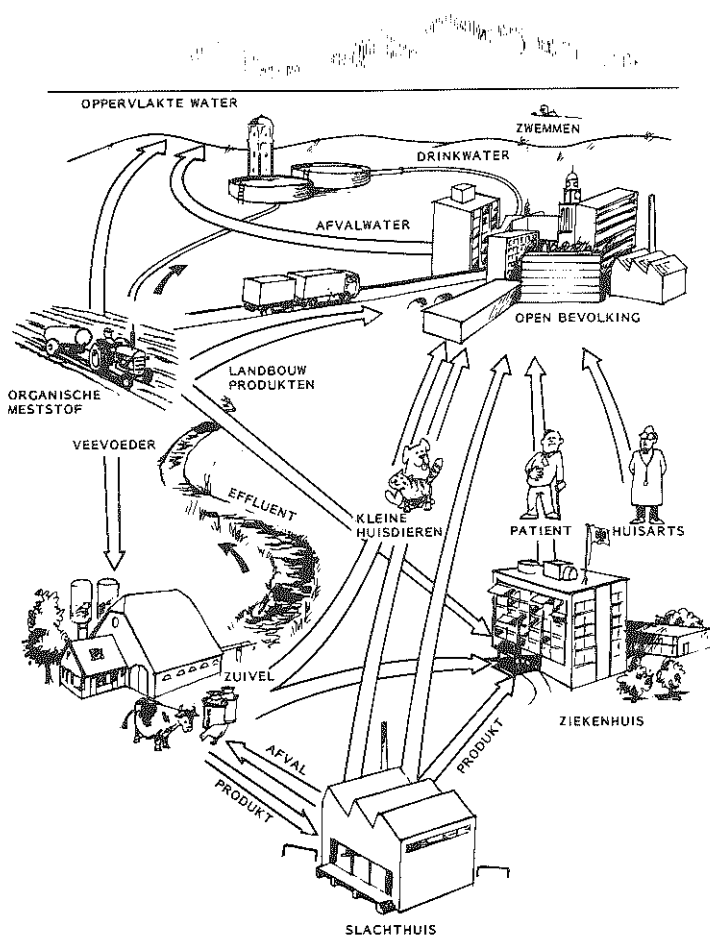
Door deze aspecten te verwerken in de vragen die in deze case control studie werden gesteld, hebben wij getracht enige risicogroepen voor het dragerschap van resistente *E. coli* te achterhalen. Wij zijn hierin niet werkelijk geslaagd. Een aanwijzing voor een geringer relatief risico werd gevonden in het gebruik van gesteriliseerde melk. Omgekeerd zou dit kunnen betekenen dat het drinken van gepasteuriseerde melk of melk van de koe een hoger relatief risico vormt. Dit is niet gevonden bij de evaluatie van de antwoorden op vraag 4 en 6. Hoewel bekend is dat ook gepasteuriseerde melk nog kleine hoeveelheden resistente *E. coli* kan bevatten (Jones 1971), moet men er mee rekening houden dat deze gevonden significantie op toeval berust.

Bij de huisartsen konden van een groot aantal personen geen gegevens worden verkregen over het gebruik van antimicrobiële middelen. Het is mogelijk dat huisartsen, die wel gegevens hebben verstrekt, op een andere wijze antimicrobiële middelen voorschrijven, dan huisartsen die deze gegevens niet hebben verstrekt. Dit is echter niet erg waarschijnlijk omdat het ontbreken van gegevens ongeveer even vaak voorkomt bij de "cases" als bij de "controls".

Dat er verder geen aanwijzingen werden gevonden voor een verhoogd relatief risico op resistentie is des te meer opmerkelijk, omdat in de case control studie onderzoek is verricht bij respondenten met een overwegend resistente *E. coli* flora. In de oorspronkelijke studie werd al een verhoogd relatief risico op de aanwezigheid van resistente *E. coli* in de faeces vastgesteld bij gebruikers van antimicrobiële middelen en bij

contacten met de veehouderij. Dit risico was onafhankelijk van de dichtheid van resistente stammen in de faeces.

Tenzij een nog onbekende risicofactor een rol speelt, moet de conclusie van deze studie dan ook luiden dat dragerschap van resistente *E. coli* een milieuprobleem is, dat diffuus in de gehele bevolking wordt aangetroffen. Hierop is door Moorhouse (1969) reeds gewezen. De mogelijkheid bestaat dat het medisch en veterinaire gebruik van antimicrobiële middelen bijdraagt tot het onderhouden van de hoge prevalentie van resistente *E. coli*. Onderzocht zal moeten worden of het voeren van een beleid bij dit gebruik de gevoeligheid van de *E. coli* flora bij de bevolking op langere termijn gunstig kan beïnvloeden. Het ontbreken van aanwijsbare risicogroepen staat de mogelijkheid om op korte termijn tot een pasklare oplossing van dit milieuprobleem te komen in de weg.



antimicrobiële middelen

Onderzoek naar de relatie tussen de resistentie van *Escherichia coli* en het gebruik van antimicrobiële middelen op verschillende ziekenhuisafdelingen.*

Inleiding.

Studies waarin de omvang van het gebruik van antimicrobiële middelen in verband wordt gebracht met de resistentie van de bacteriële flora zijn vrijwel altijd van longitudinale aard (Bauer e.a. 1960, Bulger e.a. 1970, Price e.a. 1970, Sjøgaard e.a. 1974, Mouton e.a. 1976, Weinstein e.a. 1980). Het is duidelijk dat een dergelijke opzet zich goed leent voor het volgen van ontwikkelingen ten aanzien van antimicrobiële resistentie.

Bij het onderzoek naar het voorkomen van resistente bacteriestammen in het ziekenhuis dient rekening te worden gehouden met de prevalentie van dergelijke stammen onder de normale bevolking buiten het ziekenhuis. Deze resistentie zal als regel betrekking hebben op in de huisartspraktijk gebruikelijke antimicrobiële middelen (Datta 1969, Guinée e.a. 1970, Linton e.a. 1972, Degener e.a. 1983). Het gebruik van antimicrobiële middelen in het ziekenhuis zal in deze situatie de resistentie kunnen doen toenemen. Door middel van transversaal onderzoek hebben wij getracht de omvang van de resistentie afdelingsgewijs vast te stellen. Het onderzoek vond plaats op de 10^e dag na opname. Datta (1969) heeft namelijk aangetoond dat resistentie vanaf een week na opname gaat toenemen. In faecesmonsters van deze patiënten werd de dichtheid van resistente *E. coli* stammen bepaald. Vervolgens werd per afdeling op jaarbasis de omzet van antimicrobiële middelen vergeleken met de waargenomen resistentiepercentages.

* Dit hoofdstuk wordt grotendeels gepubliceerd: Degener JE, Smit ACW, Valkenburg HA, Muller L. Resistance of *Escherichia coli* in faeces and the use of antimicrobial agents in the treatment of hospital patients. J Hyg Camb.

Materiaal en methoden.

Patiëntenpopulaties. Het onderzoek werd in 1980 en 1981 uitgevoerd op verschillende afdelingen in drie ziekenhuizen. Dit waren de afdelingen zuigelingen en kleuters, interne geneeskunde en algemene heelkunde van het centrumziekenhuis Diakonessenhuis Refaja te Dordrecht (RD), de afdelingen zuigelingen, kleuters en interne-geneeskunde voor kinderen van het Sophia Kinderziekenhuis - Academisch Ziekenhuis Rotterdam (AZR) en op afdelingen voor interne geneeskunde, heelkunde en urologie van het Ziekenhuis Dijkzigt - Academisch Ziekenhuis Rotterdam (AZR). In het onderzoek werd ernaar gestreefd op elke afdeling bij 50 opeenvolgende opnames een faecesmonster te verzamelen op de 10^e dag van het verblijf in het ziekenhuis.

Gebruik van antimicrobiële middelen. Bij elke patiënt, die bij het onderzoek werd betrokken, werd nagegaan of gedurende de opname antimicrobiële middelen werden gebruikt. Hieronder wordt in dit onderzoek verstaan de toediening gedurende tenminste 24 uur in tenminste drie doseringen van één of meer middelen. Door de ziekenhuisapotheken werden de gegevens verschaft, waarmee het gebruik van de hoofdgroepen antimicrobiële middelen konden worden berekend. Deze hoofdgroepen zijn: de smalspectrum penicillines, de breed spectrum penicillines, de cefalosporines, de aminoglycosiden en de sulfonamiden en cotrimoxazol. Voor dit onderzoek zijn de gegevens van het gebruik op jaarbasis in het jaar van onderzoek gebruikt. Het gebruik is uitgedrukt in grammen en in toedieningseenheden (tabletten, capsules, ampullen, siroopverpakkingen). Op grond van het bezettingspercentage kon het gebruik per bed worden berekend.

Faecesmonsters. Faecesmonsters werden verzameld in Amies-transportmedium en binnen 24 uur bewerkt volgens de in hoofdstuk II.1. vermelde methode.

Statistische bewerking. Het relatieve risico voor het acquireren van resistente stammen door gebruikers van antimicrobiële middelen ten opzichte van niet-gebruikers werd in de verschillende groepen patiënten berekend. Tevens werd de bij het relatieve risico behorende p-waarde berekend (Rothman e.a. 1979). De relatie tussen het gebruik van antimicrobiële middelen in het jaar van onderzoek op de afzonderlijke afdelingen en de gevonden resistentiepercentages bij de verschillende groepen van patiënten werd vastgesteld met behulp van een regressie-analyse. De p-waarde

Tabel IV.1. Aantal en percentage faecesmonsters met ampicilline-resistente *E. coli* afkomstig van patiënten* die wel of geen antimicrobiële middelen gebruiken, op verschillende afdelingen.

Afdeling	antimicrobiële middelen				totaal		Relatieve χ^2 P risico		
	wel		geen						
	resistent	monsters	resistent	monsters	resistent	monsters			
Zuigelingen AZR	12 (71)	17	13 (42)	31	25 (52)	48	1,8	1,8	0,03
Kleuters AZR	12 (63)	19	10 (34)	29	22 (46)	48	2,0	1,9	0,02
Zuigelingen en kleuters RD	5 (45)	11	8 (67)	12	13 (57)	23	0,7	-	-
Interne kinde- ren AZR	10 (71)	14	10 (31)	32	20 (43)	46	2,3	2,4	0,008
Interne volwas- senen AZR	9 (64)	14	11 (42)	26	20 (40)	40	1,5	1,3	0,09
Interne volwas- senen RD	6 (60)	10	11 (30)	37	17 (36)	47	2,0	1,8	0,04
Heelkunde AZR	5 (49)	13	6 (32)	19	11 (34)	32	1,3	0,4	0,4
Heelkunde RD	9 (53)	17	4 (13)	31	13 (27)	48	5,0	2,9	0,001
Urologie	7 (47)	15	13 (39)	33	17 (35)	48	1,2	0,5	0,4

AZR = Academisch Ziekenhuis Rotterdam

RD = Diakonessenhuis Refaja Dordrecht

() = %

*uitsluitend patiënten met *E. coli* in faeces

Tabel IV.2. Aantal en percentage faecesmonsters met $\geq 50\%$ ampicilline-resistente *E. coli* afkomstig van patiënten* die wel of geen antimicrobiële middelen gebruiken, op verschillende afdelingen.

Afdeling	antimicrobiële middelen				totaal		Relatieve χ^2 P risico		
	wel		geen						
	resistent	monsters	resistent	monsters	resistent	monsters			
Zuigelingen AZR	11 (65)	17	8 (26)	31	19 (40)	48	2,6	2,7	0,003
Kleuters AZR	11 (58)	19	6 (21)	29	17 (35)	48	2,8	3,3	< 0,001
Zuigelingen en kleuters RD	5 (46)	11	2 (17)	12	7 (30)	23	2,7	1,5	0,06
Interne kinde- ren AZR	8 (57)	14	5 (16)	32	13 (28)	46	3,5	2,9	0,002
Interne volwas- senen AZR	8 (57)	14	7 (27)	26	15 (38)	40	2,1	1,9	0,03
Interne volwas- senen RD	5 (50)	10	3 (8)	37	8 (17)	47	6,2	2,8	0,002
Heelkunde AZR	4 (31)	13	2 (11)	19	6 (19)	32	2,8	1,5	0,06
Heelkunde RD	7 (41)	17	3 (10)	31	10 (21)	48	4,6	2,5	0,006
Urologie AZR	4 (27)	15	1 (3)	33	5 (10)	48	9,0	2,4	0,008

Voetnoot als onder tabel IV.1.

voor resistentie en het percentage breedspectrum penicillinegebruik per groep patiënten werden berekend met de toets van Spearman.

Resultaten.

Faecesmonsters. Op acht afdelingen werden 43 tot 65 monsters verzameld. Op een kinderafdeling werden slechts 29 monsters verzameld, omdat de gemiddelde ligduur korter dan 10 dagen was en het beddenaantal gering.

Enterobacteriaceae of *Pseudomonas* werden uit 87% van de faecesmonsters geïsoleerd. *Escherichia coli* werd van de *Enterobacteriaceae* het meest frequent gevonden (82%). De frequentie waarmee andere *Enterobacteriaceae*-soorten werden gevonden was te gering om er verder onderzoek mee te verrichten. Het onderzoek naar het voorkomen van resistentie tegen antimicrobiële middelen heeft zich daarom beperkt tot de patiënten met *E. coli* in faeces.

Patiënten en resistente E. coli. Met uitzondering van de afdeling kleuters en zuigelingen RD, kwamen op alle afdelingen ampicilline-resistente *E. coli* vaker voor bij patiënten die antimicrobiële middelen gebruikten dan bij niet-gebruikers (tabel IV.1.). Het relatieve risico voor het dragerschap van ampicilline-resistente stammen op de afdelingen zuigelingen AZR, kleuters AZR, interne kinderen AZR, interne volwassenen RD en heelkunde RD, varieerde bij gebruikers van antimicrobiële middelen van 1,8 tot 5,0 ten opzichte van niet-gebruikers. De gevonden verschillen zijn significant ($p = 0,001 - 0,04$). In tabel IV.2. zijn van dezelfde afdelingen en groepen patiënten de gegevens te zien van faecesmonsters waarin de *E. coli* flora overwegend ($> 50\%$) resistent is. Op alle afdelingen komt bij de groepen patiënten overwegend ampicilline-resistente *E. coli* flora frequenter voor bij gebruikers van antimicrobiële middelen dan bij niet-gebruikers. Op de afdelingen zuigelingen AZR, kleuters AZR, interne kinderen AZR, interne volwassenen AZR, interne volwassenen RD, heelkunde RD en urologie AZR is dit verschil zeer significant ($p = 0,008 - < 0,001$). Met uitzondering van de afdeling heelkunde RD is het relatieve risico voor het dragerschap van een overwegend ampicilline-resistente *E. coli* flora bij gebruikers van antimicrobiële middelen ten opzichte van niet-gebruikers steeds hoger dan voor het dragerschap van ampicilline-resistente *E. coli* in het algemeen (zie tabel IV.1.) Dit relatieve risico varieerde op de verschillende afdelingen van 2,1 tot 9,0. Tetracycline- en sulfamethoxazol-resistente *E. coli* werden bij

Tabel IV.3. Aantal en percentage faecesmonsters met tetracycline-resistente *E. coli* afkomstig van patiënten* die wel of geen antimicrobiële middelen gebruiken, op verschillende afdelingen.

Afdeling	antimicrobiële middelen				totaal		Relatieve χ^2 P risico		
	wel		geen						
	resistent monsters		resistent monsters		resistent monsters				
Zuigelingen AZR	6 (35)	17	12 (39)	31	18 (38)	48	0,9	-0,2	-
Kleuters AZR	10 (53)	19	11 (38)	29	21 (44)	48	1,4	1,0	0,16
Zuigelingen en kleuters RD	4 (27)	11	2 (16)	12	6 (26)	23	2,1	1,0	0,16
Interne kinde- ren AZR	9 (64)	14	10 (31)	32	19 (41)	46	2,1	2,0	0,02
Interne volwas- senen AZR	7 (50)	14	13 (50)	26	20 (50)	40	1,0	0,0	0
Interne volwas- senen RD	5 (50)	10	11 (28)	37	16 (34)	47	1,7	1,2	0,11
Heelkunde AZR	6 (46)	13	12 (63)	19	18 (56)	32	0,7	-0,9	-
Heelkunde RD	11 (65)	17	7 (23)	31	18 (38)	48	2,8	2,9	0,002
Urologie AZR	4 (27)	15	13 (39)	33	17 (35)	48	0,7	-0,8	-

Voetnoot als onder tabel IV.1.

Tabel IV.4. Aantal en percentage faecesmonsters met $\geq 50\%$ tetracycline-resistente *E. coli* afkomstig van patiënten* die wel of geen antimicrobiële middelen gebruiken, op verschillende afdelingen.

Afdeling	antimicrobiële middelen				totaal		Relatieve χ^2 P risico		
	wel		geen						
	resistent	monsters	resistent	monsters	resistent	monsters			
Zuigelingen AZR	3 (18)	17	7 (23)	31	10 (21)	48	0,8	-	0,3
Kleuters AZR	4 (21)	19	4 (14)	29	8 (17)	48	1,5	0,6	0,27
Zuigelingen en kleuters RD	1 (9)	11	0 (0)	12	1 (4)	23	0	1,0	-
Interne kinde- ren AZR	6 (43)	14	5 (16)	32	11 (24)	46	2,7	2,1	0,02
Interne volwas- senen AZR	6 (43)	14	6 (23)	26	12 (30)	40	1,9	1,3	0,10
Interne volwas- senen RD	3 (30)	10	5 (14)	37	8 (17)	47	2,1	1,2	0,11
Heelkunde AZR	3 (23)	13	3 (10)	19	6 (19)	32	1,4	0,5	0,31
Heelkunde RD	7 (41)	17	2 (6)	31	9 (19)	48	6,8	2,9	0,002
Urologie AZR	3 (20)	15	6 (18)	33	9 (19)	48	1,1	0,2	0,42

Voetnoot als onder tabel IV.1.

Tabel IV.5. Aantal en percentage faecesmonsters met sulfamethoxazol-resistente *E. coli* afkomstig van patiënten* die wel of geen antimicrobiële middelen gebruiken, op verschillende afdelingen.

Afdeling	antimicrobiële middelen				totaal		Relatieve χ^2 P risico		
	wel		geen						
	resistent monsters		resistent monsters		resistent monsters				
Zuigelingen AZR	12 (71)	17	11 (35)	31	23 (48)	48	2,0	2,3	0,01
Kleuters AZR	10 (53)	19	10 (34)	29	20 (42)	48	1,6	1,3	0,10
Zuigelingen en kleuters RD	7 (64)	11	4 (33)	12	11 (48)	23	1,9	1,4	0,08
Interne kinde- ren AZR	10 (71)	14	8 (25)	32	18 (39)	46	2,8	3,0	0,001
Interne volwas- senen AZR	4 (29)	14	10 (38)	26	14 (35)	40	0,8	-0,6	-
Interne volwas- senen RD	8 (80)	10	15 (41)	37	23 (49)	47	2,0	2,2	0,01
Heelkunde AZR	7 (54)	13	13 (68)	19	20 (63)	32	0,8	-0,8	-
Heelkunde RD	10 (59)	17	10 (32)	31	20 (42)	48	1,8	1,7	0,04
Urologie AZR	7 (47)	15	19 (58)	33	26 (54)	48	0,8	-0,4	-

Voetnoot als onder tabel IV.1.

Tabel IV.6. Aantal en percentage faecesmonsters met $\geq 50\%$ sulfamethoxazol-resistente *E. coli* afkomstig van patiënten* die wel of geen antimicrobiële middelen gebruiken, op verschillende afdelingen.

Afdeling	antimicrobiële middelen				totaal		Relatieve χ^2 P risico		
	wel		geen						
	resistent monsters		resistent monsters		resistent monsters				
Zuigelingen AZR	10 (59)	17	9 (29)	31	19 (40)	48	2,0	2,1	0,02
Kleuters AZR	7 (37)	19	5 (17)	29	12 (25)	48	2,2	1,5	0,07
Zuigelingen en kleuters RD	6 (55)	11	2 (17)	12	8 (35)	23	3,2	1,8	0,04
Interne kinde- ren AZR	6 (43)	14	5 (16)	32	11 (24)	46	2,7	2,5	0,006
Interne volwas- senen AZR	3 (21)	14	7 (27)	26	10 (25)	40	0,8	-0,3	-
Interne volwas- senen RD	5 (50)	10	8 (22)	37	13 (28)	47	2,3	1,7	0,04
Heelkunde AZR	4 (31)	13	4 (24)	17	8 (25)	32	1,3	0,4	0,34
Heelkunde RD	6 (35)	17	4 (13)	31	10 (21)	48	2,6	1,8	0,04
Urologie	4 (27)	15	11 (33)	33	15 (31)	48	0,8	-0,5	-

Voetnoot als onder tabel IV.1.

gebruikers van antimicrobiële middelen significant vaker gevonden dan bij niet-gebruikers op respectievelijk twee en vier afdelingen (tabel IV.3. en IV.5.). Wat betreft het dragerschap van overwegend tetracycline- en sulfamethoxazol-resistente *E. coli* flora was dit op vrijwel dezelfde afdelingen het geval (respectievelijk twee en vijf) zonder dat er sprake was van een even duidelijke toename van het relatieve risico als in het geval van ampicilline (tabel IV.4. en IV.6.). Een uitzondering hierop vormt de afdeling heelkunde RD voor tetracycline. Op slechts één afdeling werden in twee monsters gentamicine-resistente *E. coli* gevonden.

Vijfendertig procent van alle patiënten (negen groepen), waarbij faecesonderzoek werd verricht, is behandeld met antimicrobiële middelen. Het gebruik van breed spectrum penicillines was het grootst. Dit was in 17-25% bij de vier groepen patiënten op de kinderafdelingen en in 9-15% bij de vijf groepen volwassen patiënten het geval. Bij de onderzochte groepen patiënten bleek er een statistisch significante correlatie te bestaan tussen het gebruik van breed spectrum penicillines in de groepen en het voorkomen van overwegend ampicilline- resistente *E. coli* flora (tabel IV.7.). Deze relatie is niet gevonden voor tetracycline en de sulfonamiden.

De tabellen IV.8. en IV.9. laten het gebruik op jaarbasis van de voor het resistentieprobleem relevante antimicrobiële middelen zien. Het gebruik is gemeten in grammen en in toedieningseenheden. Het gebruik per afdeling is omgeslagen over het aantal bedden en werd gecorrigeerd voor het bezettingspercentage. Het gebruik van breed spectrum penicillines is het grootst. Een uitzondering vormt de afdeling urologie AZR waar meer sulfonamiden en trimethoprim werden gebruikt.

Een positieve correlatie kon worden vastgesteld tussen het gebruik van breed spectrum penicillines (uitgedrukt in grammen of toedieningseenheden) en het voorkomen van overwegend resistente *E. coli* flora in faecesmonsters van patiënten op verschillende afdelingen (tabel IV.10. en fig.). Met tetracycline en de sulfonamiden werd deze correlatie niet gevonden. In de tabellen IV.8. t/m IV.10. zijn de resultaten alleen gegeven voor de afdelingen voor volwassenen. Een relatie tussen het gebruik van antimicrobiële middelen en het voorkomen van resistente *E. coli* flora is bij kinderen niet gevonden.

Tabel IV.7. Gebruik van breed spectrum penicillines en de prevalentie van overwegend (> 50% resistent) ampicilline-resistente *Escherichia coli* flora in faeces bij patiënten op verschillende afdelingen.

Afdeling	Totaal monsters met <i>Escherichia coli</i>	> 50% ampicilline resistent	Totaal onderzochte patiënten	patiënten met breed spectrum penicillines
Zuigelingen AZR	48	19 (40)	57	12 (21)
Kleuters AZR	48	17 (35)	52	13 (25)
Zuigelingen en kleuters RD	23	7 (30)	29	6 (21)
Interne kinderen AZR	46	13 (28)	59	10 (17)
Interne volwassenen AZR	40	15 (38)	47	7 (15)
Interne volwassenen RD	47	8 (17)	62	8 (13)
Heelkunde AZR	32	6 (19)	43	4 (9)
Heelkunde RD	48	10 (21)	63	7 (11)
Urologie AZR	48	5 (10)	53	6 (11)
P		< 0,05		
Lineaire regressie		$y = 1,42x + 3,86$		
r		0,76		

Voetnoot als onder tabel IV.1.

Tabel IV.8. Gebruik van antimicrobiële middelen in grammen per bed* op vijf verschillende afdelingen.

Antimicrobiële middelen	Interne Geneeskunde	Interne Geneeskunde	Heelkunde	Heelkunde	Urologie
	AZR	RD	AZR	RD	AZR
smalspectrum penicillines	16,1 (11)	31,4 (20)	9,1 (9)	45,4 (26)	2,7 (2)
breedspectrum penicillines	100 (69)	76,6 (48)	49,7 (50)	80,2 (47)	50,5 (34)
tetracyclines	0,4 (0)	1,1 (1)	0,1 (0)	1,9 (1)	0,2 (0)
sulfonamiden en cotrimoxazol	9,8 (7)	28,2 (18)	19,9 (20)	27,1 (16)	71,4 (48)
aminoglycosiden	2,2 (2)	2,9 (2)	2,6 (3)	3,5 (2)	2,7 (2)
cefalosporines	17 (12)	20,3 (13)	18,6 (19)	13,3 (8)	22,3 (15)
Totaal in grammen	145,5 (100)	160,5 (100)	100,0 (100)	171,5 (100)	149,9 (100)

*gecorrigeerd voor het bezettingspercentage

() = percentage van totaal aantal grammen

Tabel IV.9. Gebruik van antimicrobiële middelen in toedieningseenheden per bed* op vijf verschillende afdelingen.

Antimicrobiële middelen	Interne Geneeskunde	Interne Geneeskunde	Heelkunde	Heelkunde	Urologie
	AZR	RD	AZR	RD	AZR
smalspectrum penicillines	16 (7)	49 (18)	16 (9)	90 (24)	3 (1)
breedspectrum penicillines	156 (66)	121 (45)	77 (43)	172 (46)	114 (36)
tetracyclines	4 (2)	10 (4)	1 (1)	17 (5)	2 (1)
sulfonamiden en cotrimoxazol	20 (8)	51 (19)	39 (22)	53 (14)	149 (47)
aminoglycosiden	24 (10)	20 (7)	26 (15)	25 (7)	25 (8)
cefalosporines	17 (7)	17 (6)	19 (11)	15 (4)	22 (7)
Totaal toedieningseenheden	237 (100)	268 (100)	179 (100)	372 (100)	315 (100)

*gecorrigeerd voor het bezettingspercentage

() = percentage van totaal aantal toedieningseenheden

Tabel IV.10. Jaarlijks gebruik van antimicrobiële middelen en de prevalentie van overwegend ($\geq 50\%$) ampicilline-resistente *E. coli* stammen in faecesmonsters van patiënten op verschillende afdelingen.

Afdeling	Interne Geneeskunde AZR	Interne Geneeskunde RD	Heelkunde AZR	Heelkunde RD	Urologie AZR	Resistentie en jaarlijks gebruik regressie vergelijking r
Resistent* ($\geq 50\%$)	38%	17%	19%	21%	10%	
Jaarlijks gebruik in grammen	3930,0	20535,3	4999,6	22801,2	3896,3	
breedspectrum penicilline: percentage** per bed	69% 100,0	48% 76,6	50% 49,7	47% 80,2	34% 50,5	$y=0,81x-19,0$ 0,97 $y=0,40x-7,8$ 0,83
Jaarlijks gebruik in doseringseenheden	6390	34321	8950	49492	8200	
breedspectrum penicilline: percentage** per bed	66% 156	45% 121	43% 77	46% 172	36% 114	$y=0,91x-22,2$ 0,99 $y=1,64x-150$ 0,71

Voetnoot als onder tabel IV.1.

*percentage faecesmonsters met een overwegend resistente ($\geq 50\%$) *E. coli* flora.

**percentage van het gebruik van alle andere antimicrobiële middelen samen (zie Tabel IV.8 en 9).

Discussie.

In een aantal epidemiologische studies is getracht de omvang van de resistentie van bacteriën die buiten het ziekenhuis werden geïsoleerd vast te stellen. (Guinée e.a. 1970, Datta 1971, Linton e.a. 1972, Degener e.a. 1983). De prevalentie van het dragerschap van resistente *Enterobacteriaceae* buiten het ziekenhuis is hoog en varieert in verschillende "normale" populaties voor één of meer middelen tegelijk van 30% tot 74%.

In ziekenhuizen is het eenvoudiger om de invloed van het gebruik van antimicrobiële middelen op het ontstaan van resistentie te bestuderen dan in de algemene praktijk. Intramuraal onderzoek wordt echter bemoeilijkt doordat een groot deel van de patiënten dat wordt opgenomen al drager is van resistente stammen. Datta heeft aangetoond dat ziekenhuisverblijf vooral van invloed is op de dichtheid van resistente *E. coli* in de darm (Datta 1969). Ook uit ons onderzoek blijkt dat voor studies naar resistentie kwantitatief faecesonderzoek belangrijk is. Verschillen tussen gebruikers en niet-gebruikers van antimicrobiële middelen worden met name gevonden op het niveau van overwegend ($> 50\%$) resistente *E. coli* in de faeces.

Van de door ons onderzochte patiënten gebruikte 35% een antimicrobieel middel. Dit percentage is goed vergelijkbaar met dat in andere studies over gebruik van antimicrobiële middelen in ziekenhuizen (Scheckler e.a. 1970, McGowan e.a. 1974A en B, Simmons e.a. 1974, Latorracca e.a. 1979, Townsend e.a. 1979A, D. Cooke e.a. 1980, Jogerst e.a. 1981, Moss e.a. 1981). In deze en in andere studies was het gebruik van breed spectrum penicillines het grootst. Het lineaire verband tussen jaarlijks gebruik en het voorkomen van een overwegend resistente *E. coli* flora bij groepen patiënten op verschillende afdelingen wordt alleen gevonden bij volwassenen, niet bij kinderen. De mogelijkheid bestaat dat dit wordt veroorzaakt doordat de hoeveelheid antimicrobiële stof, die per kind wordt toegediend, geringer is dan bij volwassenen (Townsend e.a. 1979B). Dit was in ons onderzoek niet na te gaan.

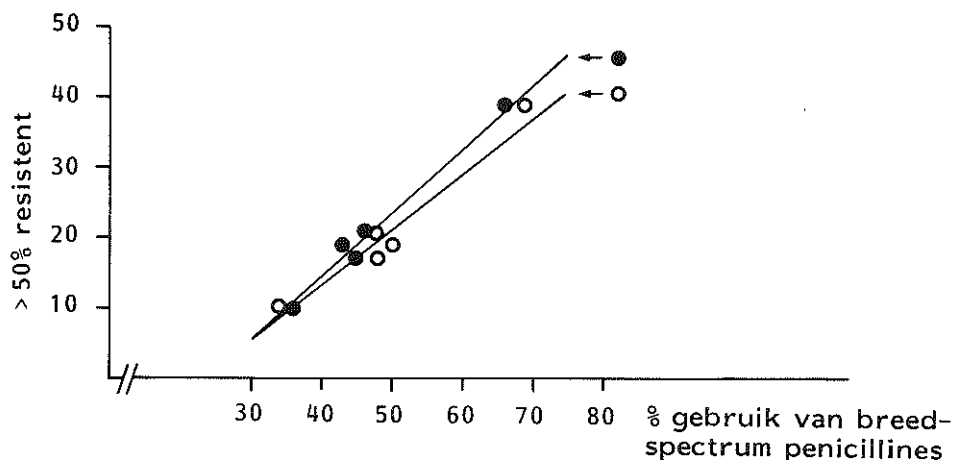
Met longitudinale studies is een verband aangetoond tussen gebruik van antimicrobiële middelen en het voorkomen van *Enterobacteriaceae* en *Pseudomonas*. Deze studies strekken zich uit over vele jaren. Op deze wijze kan men met het toenemend gebruik van antimicrobiële middelen een toenemende frequentie van resistente bacteriestammen waarnemen (Mouton

e.a. 1976, Weinstein e.a. 1980). Omgekeerd kan met longitudinale studies ook worden aangetoond, dat met afnemend gebruik van een bepaald middel de frequentie van stammen die resistent zijn tegen het desbetreffende middel, afneemt (Bulger e.a. 1970, Price e.a. 1970, Sjøgaard e.a. 1974, Mouton e.a. 1976).

Wij hebben aangetoond dat transversaal onderzoek, verricht op verschillende klinische afdelingen, op korte termijn inzicht kan verschaffen in de ontwikkeling van resistentie ten aanzien van breedspectrum penicillines. In een andere klinische situatie is dit op vergelijkbare wijze mogelijk gebleken voor gentamicine (Block 1978). Tijdens ons onderzoek werd gentamicine-resistentie nog weinig gevonden.

Voor het aantonen van relaties tussen prevalentie van resistente stammen en gebruik van antimicrobiële middelen zijn kennelijk betrekkelijk geringe aantallen patiënten nodig. De invloed van antimicrobiële middelen op de bacterieflora manifesteert zich vermoedelijk zeer snel en krachtig.

De relatie tussen de hoogte van de dosis van een antimicrobieel middel en kolonisatie van de darm door resistente *E. coli* stammen is in dit onderzoek niet nagegaan. Burton e.a. hebben bij vrijwilligers aangetoond dat hoge dosering van tetracycline kan leiden tot langdurig dragerschap van een overwegend resistente *E. coli* flora. Dit was niet het geval bij mensen die lage doses tetracycline kregen toegediend (Burton e.a. 1974).



Percentage faecesmonsters met overwegend resistente *E.coli* flora in het ziekenhuis, en het jaarlijks gebruik van breedspectrum penicilines in deze afdelingen.

- o = gebruik van breedspectrum penicilines in grammen
- = gebruik van breedspectrum penicilines in toedieningseenheden

Appendix.

Acquisitie van resistente *Escherichia coli* in de darm tijdens verblijf in het ziekenhuis.

Inleiding.

In het hierboven beschreven transversaal onderzoek kon een positieve correlatie worden aangetoond tussen het dragerschap van resistente *E. coli* bij patiënten in het ziekenhuis en het gebruik van antimicrobiële middelen. Hiertoe werd bij de patiënten faecesonderzoek verricht op de 10^e dag van opname. Een toename van resistente stammen in de darm kan na ongeveer een week na opname in het ziekenhuis worden waargenomen (Datta 1969). Verzamelt men de faecesmonsters later dan 10 dagen na opname, dan wordt het aantal uitvallers groot, omdat inmiddels veel patiënten zijn ontslagen.

Door de wijze waarop wij onze studie hebben verricht, blijft de vraag of patiënten ook zonder het gebruik van antimicrobiële middelen in het ziekenhuis resistente stammen acquireren onbeantwoord (Young 1982). Deze is alleen te beantwoorden door longitudinaal onderzoek te verrichten. Daarom hebben wij bij een aantal patiënten tijdens opname serieel onderzoek van de gevoeligheid van *E. coli* in faeces verricht. Hiervoor werd een afdeling in het ziekenhuis gekozen, waar ongeveer 30% van de patiënten een antimicrobieel middel gebruikte.

Materiaal en methoden.

Patiënten. Het longitudinaal onderzoek heeft plaatsgevonden op dezelfde afdeling interne geneeskunde in het Academisch Ziekenhuis Rotterdam, waar ook het transversale onderzoek werd verricht. In het transversale onderzoek werd door 32% van de patiënten op die afdeling antimicrobiële middelen gebruikt. In het longitudinaal onderzoek is ernaar gestreefd bij tenminste 150 patiënten, die opeenvolgend werden opgenomen, op de eerste, vijfde en de 10^e dag een faecesmonsters te verzamelen. Op deze wijze konden twee groepen patiënten van redelijke omvang worden gevormd waarvan een groep wel en een andere groep geen antimicrobiële middelen had gebruikt. Bij alle patiënten werden de volgende gegevens verzameld:

Tabel IV.11. Prevalentie van resistente *E. coli* en overwegend resistente (> 50%) *E. coli* flora in faecesmonsters van twee groepen patiënten op verschillende tijdstippen tijdens opname in het ziekenhuis.

	resistente <i>E. coli</i>		overwegend resistente <i>E. coli</i> flora	
	antimicrobiële middelen		antimicrobiële middelen	
	wel	geen	wel	geen
dag 1	12 (76)	44 (62)	8 (38)	16 (23)
dag 5	14 (67)	35 (49)	7 (33)	12 (17)
dag 10	15 (71)	36 (51)	8 (38)	14 (20)
totaal	21 (100)	71 (100)	21 (100)	71 (100)

() = %

Tabel IV.12. Toename of afname van het aantal resistente *E. coli* stammen in faecesmonsters van twee groepen patiënten tijdens opname in het ziekenhuis.

Aantal resistenten- te stammen	gebruik van antimicrobiële middelen		RR	P
	wel	geen		
toename	7 (33)	11 (15)	2,2	0,04
afname	6 (29)	21 (30)	0,9	0,5
geen toename of af- name	8 (38)	39 (55)	0,7	0,09
totaal monsters	21 (100)	71 (100)		

() = %

1. Gebruik van antimicrobiële middelen direct voor opname in het ziekenhuis.
2. Gebruik van antimicrobiële middelen tijdens opname.
3. Ziekenhuisopnames over een periode van 12 maanden voorafgaande aan de huidige opname.

Faecesmonsters. Omdat het verzamelen van faecesmonsters na spontane defaecatie bij gehospitaliseerde patiënten op vaste tijdstippen niet haalbaar is, is in dit onderzoek volstaan met het verzamelen van rectaal afgenomen monsters. Met een wattendrager werd voldoende faeces verzameld voor de uitvoering van de in hoofdstuk II.1. beschreven methode voor het bepalen van de aanwezigheid van resistente bacteriestammen.

Resultaten.

Bij 92 van 156 patiënten kon een serie van drie faecesmonsters op de eerste, de vijfde en de 10^e dag van opname worden verzameld. Een groep van 21 patiënten kreeg een antimicrobieel middel. Van de 21 patiënten, die in het ziekenhuis antimicrobiële therapie kregen, hadden 14 voor opname reeds een antimicrobieel middel ontvangen, of waren recent elders opgenomen geweest. Dit aantal bedroeg 22 van 71, die in het ziekenhuis geen antimicrobiële therapie ontvingen ($\chi^2 = 8,7$, $p < 0,01$). Patiënten die tijdens opname een antimicrobieel middel krijgen toegediend, blijken op het moment van opname in het ziekenhuis al een geselecteerde groep te vormen.

Leest men tabel IV.11. verticaal, dan is te zien dat van de eerste tot en met de 10^e dag van de opname geen toename plaatsvindt van het aantal patiënten met resistente of overwegend resistente *E. coli* flora. Het betreft resistentie tegen ampicilline, tetracycline en sulfamethoxazol samen. De resultaten voor resistentie tegen deze middelen afzonderlijk wijken niet af van de resultaten voor resistentie tegen één of meer van deze middelen.

De groep patiënten die antimicrobiële middelen gebruikt, is vergeleken met de groep die geen antimicrobiële middelen gebruikt (tabel IV.11., horizontaal). Tijdens verblijf in het ziekenhuis wordt bij patiënten die antimicrobiële middelen gebruiken frequenter dragerschap van resistente *E. coli* en een overwegend resistente *E. coli* flora aangetroffen. Op de

10^e dag is het verschil significant ten opzichte van patiënten die geen antimicrobiële middelen krijgen. Dit wordt eerder verklaard door een verlies aan resistentie bij patiënten die geen antimicrobiële middelen krijgen dan door een toename van de resistentie bij patiënten die deze middelen wel krijgen.

Als men de patiënten individueel beschouwt blijkt bij een aantal patiënten de resistente flora in de darm toe te nemen. Bij anderen neemt het percentage resistente stammen in de darm juist af tijdens verblijf in het ziekenhuis (tabel IV.12.). Bij individuele patiënten, die een antimicrobieel middel krijgen toegediend, wordt echter iets vaker een toename van resistente stammen in de darm gezien dan bij patiënten die geen antimicrobiële therapie krijgen ($p = 0,04$).

Discussie.

Wanneer patiënten in het ziekenhuis worden opgenomen, presenteren zij zich al zeer frequent met een resistente *E. coli* flora. De in ons onderzoek gevonden frequentie op de eerste dag van opname is bij benadering gelijk aan de gevonden frequentie bij de open bevolking van Zoetermeer en Overschie (66%). Tijdens opname in het ziekenhuis komen geen opmerkelijke verschuivingen voor in het dragerschap van resistente stammen bij groepen patiënten. Bij sommigen neemt het aantal resistente stammen in de darm tijdens opname toe, bij anderen neemt dit juist af. Van deze bevinding wordt ook melding gemaakt in de studie van Datta (1969). In haar studie kon door het geringe aantal patiënten geen onderscheid worden gemaakt in gebruikers en niet-gebruikers van antimicrobiële middelen. Uit ons onderzoek komt naar voren dat de frequentie waarmee resistente stammen worden gevonden, bij patiënten die geen antimicrobiële middelen gebruiken, tijdens opname niet toeneemt. Bovendien is gevonden, dat er tijdens opname een verschil ontstaat tussen patiënten die wel en patiënten die geen antimicrobiële therapie krijgen. Dit verschil is significant op de 10^e opnamedag. Hierdoor is tevens aangetoond dat het verrichten van onderzoek op de 10^e dag van opname zinvol is, wanneer men de invloed van antimicrobiële middelen op de prevalentie van resistente stammen tijdens verblijf in het ziekenhuis wil bestuderen.

Resistentiepatronen van *Escherichia coli* stammen, geïsoleerd uit faecesmonsters, binnen en buiten het ziekenhuis.

Inleiding.

In het hiervoor beschreven onderzoek is met behulp van ampicilline, tetracycline, sulfamethoxazol en gentamicine bevattende voedingsbodems de prevalentie van ongevoelige *E. coli* stammen in de faeces bij de open bevolking en bij patiënten in het ziekenhuis vastgesteld. In dit onderzoek betreft het uitsluitend personen, bij wie *E. coli* uit faeces werd gekweekt. Het aantal antimicrobiële middelen, waarvoor in deze studie de resistentie is onderzocht, is om praktische redenen beperkt gebleven. Het aantal verschillende antimicrobiële middelen, dat in de praktijk binnen en buiten het ziekenhuis wordt toegepast is echter aanzienlijk groter.

Voor de praktijk is het van belang te weten:

1. hoe groot de omvang is van de resistentie voor een uitgebreide reeks antimicrobiële middelen binnen en buiten het ziekenhuis
2. hoe de resistentiepatronen van *E. coli* bacteriën ten opzichte van de verschillende antimicrobiële middelen zich verhouden binnen en buiten het ziekenhuis.

Om deze vragen te kunnen beantwoorden is met de mechanische MS-2 methode (zie hoofdstuk II.2.) de gevoeligheid bepaald van een selectie van de *E. coli* stammen voor drie van de bovengenoemde middelen en nog zes andere middelen.

Materiaal en methoden.

E. coli stammen uit de open bevolking. In het onderzoek bij de open bevolking van 6 jaar en ouder werden 173 faecesmonsters verzameld met voor ampicilline, tetracycline en sulfamethoxazol gevoelige stammen (zie hoofdstuk III). Deze stammen werden in drooggevroren toestand bewaard (zie hoofdstuk II). Hiervan is systematisch een stam uit telkens drie monsters getrokken en opnieuw in cultuur gebracht. Op dezelfde wijze zijn ampicilline-, tetracycline- en sulfamethoxazol-resistente stammen getrokken (tabel V.1.). Omdat buiten het ziekenhuis tetracycline-resistentie

Tabel V.1. Gevoeligheid voor drie antimicrobiële middelen, bepaald met selectieve media, van *E. coli* stammen, geïsoleerd uit faecesmonsters van de open bevolking van Zoetermeer.

Stammen	gevoelig	resistent				totaal				
		ampicilline	tetracycline	sulfamethoxazol	een of meer van deze drie middelen					
aantal	173 (35)	142	(25) *	240	(42) *	221	(45)	318	(65)	491 (100)
gewogen aantal	173 (35)	123	(15) **	206 **	(24) **	221	(26)	550	(65)	723 (100)
steekproef	1:3	1:3		1:2		1:4		-		-
beschikbare stammen	56	41		120		52		-		-

() = %

* percentage van totaal 577 stammen, zie Tabel III.2.

**aantal en percentage gecorrigeerd voor 491 stammen, zie Tabel III.2.

tot nu toe als het belangrijkste probleem wordt beschouwd, is een groter aantal voor tetracycline ongevoelige stammen onderzocht op gevoeligheid voor andere middelen.

E. coli stammen uit het ziekenhuis. Van de *E. coli* stammen die uit faeces van patiënten werden verzameld, zijn alle voor ampicilline ongevoelige stammen onderzocht. Resistentie voor ampicilline kwam in ons onderzoek in het ziekenhuis het meest frequent voor.

Gevoeligheidsbepaling met de MS-2. Alle beschikbare *E. coli* stammen werden met de MS-2 onderzocht. Hierbij werd de procedure gevolgd, zoals in hoofdstuk II.2. is beschreven. De antimicrobiële middelen en de gevoeligheidsgrenzen die in dit onderzoek werden gehanteerd zijn vermeld in tabel V.2. en V.5. Tijdens elke reeks gevoeligheidsbepalingen werden drie controle stammen mede onderzocht. Dit waren de gevoelige *E. coli* ATCC 29194, *Pseudomonas* ATCC 27853 en een multiresistente stam.

Statistische berekeningen. Significante verschillen werden berekend met de door Rothman aangegeven methode (Rothman e.a. 1979, zie ook hoofdstuk III, materiaal en methoden).

Resultaten.

E. coli stammen uit de open bevolking. Met de systematische steekproef uit de stammencollectie van de open bevolking kwamen 56 gevoelige en respectievelijk 41, 120 en 52 voor ampicilline-, tetracycline- en sulfamethoxazol- resistente stammen beschikbaar (tabel V.1.). De stammen uit deze steekproef representeren de in het bevolkingsonderzoek gevonden stammen uit faecesmonsters met voor deze middelen gevoelige stammen (35%) en voor één of meer van deze middelen ongevoelige stammen (65%) (tabel V.1.).

De stammen uit deze steekproef zijn voor een uitgebreid scala van negen antimicrobiële middelen onderzocht met de mechanische MS-2 methode (tabel V.2.). Uit de resultaten met de MS-2 blijkt, dat 54% van de voor ampicilline, tetracycline en sulfamethoxazol gevoelige stammen, ook gevoelig is voor de overige met de MS-2 onderzochte middelen (tabel V.2.). Zes stammen zijn in dit onderzoek amoxicilline-resistent en vier stammen zijn cotrimoxazol- resistent. De verklaring hiervoor is dat de concentraties in de selectieve media, waarmee resistente stammen uit faeces werden geïsoleerd, hoger waren dan in de MS-2. Hierdoor kan een aantal intermediaire stammen voorkomen dat gevoelig was in het bevolkingsonderzoek maar resis-

Tabel V.2. Gevoeligheid voor negen antimicrobiële middelen, bepaald met MS-2, van *E. coli* stammen, geïsoleerd uit faeces-monsters van de open bevolking van Zoetermeer.

Antimicrobieel MRC-grens middel (µg/ml)		<i>E. coli</i> stammen			
		gevoelig voor A, T, S*	resistent		
			A	T	S
gevoelig	-	30 (54)*	0	0	0
amoxicilline	> 24	6 (11)	39 (95) ⁺⁺	30 (25)	3 (6)
cefalotine	> 30	12 (21)	22 (54)	20 (17)	4 (8)
kanamycine	> 24	2 (4)	6 (15)	16 (13)	7 (13)
gentamicine	> 12	0	0	0	0
amikacine	> 24	0	0	0	0
chlooramfenicol	> 27	2 (4)	7 (17)	16 (13)	7 (13)
tetracycline	> 15	0	17 (41)	120 (100)	23 (44)
cotrimoxazol	> 75**	4 (7)	8 (20)	13 (11)	6 (12) ⁺
nitrofurantoïne	> 30	3 (5)	11 (27)	22 (18)	5 (10)
totaal stammen		56 (100)	41 (100)	120 (100)	52 (100)

* A = ampicilline, T = tetracycline, S = sulfamethoxazol

** in de verhouding sulfamethoxazol:trimethoprim = 20:1

+ gevoeligheid voor sulfonamiden alléén niet te bepalen met MS-2

++ twee stammen niet amoxicilline resistent in MS-2, wel resistent voor andere middelen

() = %

tent is met de MS-2.

Van de in de open bevolking gevonden ampicilline-resistente stammen, blijken er twee hun resistentie te hebben verloren. Alle tetracycline-resistente stammen zijn ook met de MS-2 tetracycline-resistent. De gevoeligheid voor sulfamethoxazol kan met de MS-2 niet worden bepaald. Van de in het bevolkingsonderzoek gevonden sulfamethoxazol-resistente stammen was 12% resistent voor de combinatie van sulfamethoxazol en trimethoprim. Bij een aanvullend onderzoek met trimethoprim schijfjes (1,25 µg trimethoprim) met de agar-diffusiemethode bleek dit in alle gevallen op trimethoprim-resistentie te berusten.

Bij ampicilline-resistente stammen werd frequent gecombineerde resistentie met andere middelen gevonden. Van deze stammen was 54% ongevoelig voor cefalotine en 41% voor tetracycline. Ongevoelige stammen uit de open bevolking zijn een enkele maal ook ongevoelig voor kanamycine, maar vertonen geen resistentie voor gentamicine of amikacine.

Het doel van dit onderzoek was het verzamelen van gegevens over de prevalentie van resistentie in de open bevolking. Dit is reeds beschreven voor ampicilline, tetracycline en sulfamethoxazol (hoofdstuk III en tabel V.1.). Hierbij is gebruik gemaakt van selectieve media met telkens één middel (hoofdstuk II.1.). Gecombineerde resistentie voor ampicilline, tetracycline en sulfamethoxazol kon met deze methode niet worden opgespoord. Hierdoor is het niet mogelijk de omvang van de resistentie voor de andere met de MS-2 bepaalde middelen direct te berekenen. Met behulp van de gegevens uit tabel V.2. en de bekende prevalentie van resistentie voor ampicilline, tetracycline en sulfamethoxazol kan echter een schatting worden gemaakt van de prevalentie van resistentie voor elk van de negen middelen.

Een minimale schatting wordt verkregen uit het product van de frequentie waarmee resistentie voor ieder van de negen middelen wordt gevonden en de frequentie waarmee met dezelfde stammen resistentie of gevoeligheid voor ampicilline, tetracycline en sulfamethoxazol in het oorspronkelijke onderzoek werd gevonden.

Voorbeeld: cefalotine-resistentie komt voor bij 21% van de gevoelige stammen. Dit is $0,21 \times 0,35 = 0,07$ van het totaal aantal stammen. Verder komt cefalotine-resistentie voor bij 54% van de ampicilline-resistente stammen. Dit is $0,54 \times 0,25 = 0,14$ van het totaal aantal stammen. Op dezelfde wijze omgerekend voor tetracycline- en sulfamethoxazol-resistente stammen is dit respectievelijk 0,07 en 0,04. De hoogst gevonden fre-

Tabel V.3. *Schatting van de frekwentie, waarmee in de open bevolking resistentie voor antimicrobiële middelen van E. coli uit faecesmonsters wordt gevonden.*

	minimaal	gewogen
resistentie	%	%
geen	19	19
amoxicilline	25	26
cefalotine	14	22
kanamycine	6	7
gentamicine	0	0
amikacine	0	0
chlooramfenicol	6	10
tetracycline	42	42
cotrimoxazol	5	11
sulfamethoxazol*	45	-
nitrofurantoin	8	13

* niet bepaald met MS-2

Tabel V.4. Ampicilline resistente *E. coli* stammen, geïsoleerd uit faecesmonsters van patiënten in een centrum ziekenhuis (RD) en in een academisch ziekenhuis (AZR).

	RD	AZR	
		volwassenen	kinderen
monsters met ampicilline			
resistente <i>E. coli</i> *	43 (36%)	48 (40%)	67 (47%)
aantal beschikbare stammen	41	46	67

*zie tabel IV.2.

() = % van totaal aantal *E. coli* bevattende monsters

Tabel V.5. Gevoeligheid voor antimicrobiële middelen, bepaald met MS-2, van ampicilline resistente *E. coli* stammen, geïsoleerd uit faecesmonsters van de open bevolking en van patiënten uit een centrum ziekenhuis (RD) en uit een academisch ziekenhuis (AZR).

Resistentie	MRC grens (µg/ml)	ampicilline resistente <i>E. coli</i> stammen			
		RD	AZR		
		open bevolking	volwas- senen	kinde- ren	
amoxicilline	> 24	39** (95)	40** (98)	46 (100)	67 (100)
cefalotine	> 30	22 (54)	17 (41)	19 (41)	26 (39)
kanamycine	> 24	6 (15)	11 (27)	5 (11)	16 (24)
gentamicine	> 12	0	0	1 (2)	0
amikacine	> 24	0	0	0	0
chlooramfenicol	> 27	7 (17)	14 (34) ⁺	16 (35) ⁺	36 (54) ⁺⁺⁺
tetracycline	> 15	17 (41)	28 (68) ⁺⁺	26 (57)	38 (57)
sulfamethoxazol/ trimethoprim*	> 75	8 (20)	13 (32)	15 (33)	16 (24)
nitrofurantoïne	> 30	11 (27)	4 (10)	8 (17)	12 (18)
totaal stammen		41 (100)	41 (100)	46 (100)	67 (100)

* zie voetnoot onder tabel V.2.

** drie stammen hebben tijdens het bewaren hun resistentie verloren

⁺ p < 0,05 ten opzichte van open bevolking

⁺⁺ p < 0,01 ten opzichte van open bevolking

⁺⁺⁺ p < 0,001 ten opzichte van open bevolking

quentie voor cefalotine is 0,14 (tabel V.3.). Dit is de minimale schatting, omdat de werkelijke frequentie hoger is. Immers, de in de open bevolking verzamelde faecesmonsters met ampicilline-, tetracycline- en sulfamethoxazol-resistente stammen zijn voor een deel dezelfde.

Een benadering van de reële frequentie is te berekenen door een gewogen schatting te maken. Hierbij zijn wij weer uitgegaan van de frequentie van resistentie voor ampicilline, tetracycline en sulfamethoxazol, die in het oorspronkelijke onderzoek gevonden is in 491 faecesmonsters uit de open bevolking. Een correctie is gemaakt voor de 142 voor ampicilline- en de 240 voor tetracycline-resistente stammen, die in 577 monsters werden gevonden (zie ook hoofdstuk III, tabel III.2.). Het gewogen percentage ampicilline-, tetracycline- en sulfamethoxazol- resistente stammen wordt berekend uit de verdeling van deze stammen over het totaal aantal stammen, vermenigvuldigd met 65%.

Voorbeeld: het gewogen percentage ampicilline-resistente stammen is $\frac{123}{550} \times 0,65 = 0,15$ (tabel V.1.).

De som van de producten van de gewogen frequenties met de voor negen middelen gevonden frequenties van resistentie geeft de gewogen schatting in tabel V.3. voor de open bevolking.

Voorbeeld: de gewogen schatting voor cefalotine-resistentie in de open bevolking is: $(0,35 \times 0,21) + (0,15 \times 0,54) + (0,24 \times 0,17) + (0,26 \times 0,08) = 0,22$ (tabel V.3.).

De gewogen schatting is waarschijnlijk iets hoger dan de reële frequentie omdat ook hier geldt dat de voor ampicilline-, tetracycline- en sulfamethoxazol-resistente stammen voor een deel uit dezelfde monsters afkomstig zijn.

E. coli stammen uit het ziekenhuis. Van alle in het ziekenhuis verzamelde ampicilline-resistente *E. coli* stammen (tabel V.4.) is met de MS-2 de gevoeligheid voor negen antimicrobiële middelen bepaald. De resultaten van de gevoeligheidsbepalingen met de MS-2 worden getoond in tabel V.5. Voor de vergelijkbaarheid zijn de gegevens van ampicilline-resistente stammen uit de open bevolking eveneens in deze tabel opgenomen. Ampicilline- resistente stammen afkomstig van patiënten in het ziekenhuis zijn vaker resistent voor chlooramfenicol ($p < 0,05$ - $p < 0,001$) en voor tetracycline dan bij personen buiten het ziekenhuis ($p < 0,01$). Bij ampicilline-resistente stammen, afkomstig van patiënten uit het centrumziekenhuis (RD) en van volwassen patiënten uit het academisch ziekenhuis (AZR), kwam frequenter resistentie tegen vier of meer middelen tegelijk voor dan

Tabel V.6. Enkelvoudige of meervoudige resistentie voor antimicrobiële middelen van ampicilline resistente *E. coli* stammen, geïsoleerd uit faecesmonsters van de open bevolking en van patiënten uit een centrum ziekenhuis (RD) en een academisch ziekenhuis (AZR).

Aantal middelen waarvoor resistentie gevonden is	open bevolking	RD *	AZR	
			volwas- senen**	kinder- ren
geén	0	1 (2)	0	0
een	9 (22)	8 (18)	9 (21)	10 (16)
twee	11 (27)	9 (22)	10 (22)	13 (19)
drie	12 (29)	6 (15)	11 (24)	18 (27)
vier	3 (7)	6 (15)	9 (21)	14 (21)
vijf	3 (7)	8 (20)	4 (9)	7 (10)
zes	1 (2)	3 (7)	2 (4)	4 (6)
zeven	2 (5)	0	1 (2)	1 (1)
acht	0	0	0	0
totaal	41 (100)	41 (100)	46 (100)	67 (100)

*resistentie voor vier of meer middelen significant verschillend ten opzichte van de open bevolking ($P = 0,03$).

**resistentie voor vier of meer middelen significant verschillend ten opzichte van de open bevolking ($P = 0,04$).

bij ampicilline-resistente stammen van buiten het ziekenhuis (respectievelijk $p = 0,03$ en $p = 0,04$) (tabel V.6.).

Discussie.

E. coli stammen uit de open bevolking. Bij het oorspronkelijke onderzoek naar het voorkomen van resistentie bij bacteriën in de open bevolking is gebruik gemaakt van drie antimicrobiële middelen bevattende selectieve kweekmedia. Stammen die gevoelig zijn voor deze drie middelen blijken voor ongeveer de helft ongevoelig te zijn voor andere antimicrobiële middelen. Een schatting heeft ons opgeleverd dat 81% van de *E. coli* stammen uit de open bevolking resistent is voor één of meer van negen van deze middelen. In het oorspronkelijk onderzoek bij de open bevolking van 6 jaar en ouder was dit 65% voor één of meer van drie middelen.

Hoewel cefalosporines en kanamycine in de huisartspraktijk nauwelijks worden gebruikt, kan resistentie tegen deze middelen toch worden aangetroffen. De gewogen prevalentie van 22% voor cefalotine-resistente stammen in de open bevolking geeft aanleiding tot bezorgdheid omdat cefalosporines een belangrijke rol spelen bij de behandeling van ernstige infecties in het ziekenhuis. Wat de oorzaak is voor deze hoge prevalentie is niet bekend. Men kan zich afvragen of dit komt door introductie in het open milieu van cefalotine-resistente stammen door uit het ziekenhuis ontslagen patiënten.

Hoewel sulfamethoxazol-resistente stammen in het open milieu zeer frequent voorkomen, wordt cotrimoxazol-resistentie veel minder vaak gezien. Bij sulfamethoxazol-resistente stammen, die cotrimoxazol-resistent waren, bleek deze resistentie tevens te berusten op resistentie voor trimethoprim. Resistentie voor trimethoprim werd slechts bij 5% van alle stammen uit de open bevolking gevonden. Uit de resultaten van gevoeligheidsonderzoek van *E. coli* isolaten uit urinemonsters van patiënten met urineweginfecties in huisartspraktijken in Engeland, concludeerde Grüneberg dat de trimethoprimcomponent in de eerste plaats verantwoordelijk was voor het brede werkingsspectrum van het combinatiepreparaat cotrimoxazol (Grüneberg 1980). De berichten over trimethoprim-resistentie bij bacteriën geïsoleerd uit urinemonsters vertonen sterke geografische verschillen. Waarschijnlijk is dit afhankelijk van de lengte van de termijn, waarin het middel als monotherapie op verschillende plaatsen in de algemene praktijk in gebruik is. (Hamilton-Miller 1979, Britisch Medical

Journal. Editorial. 1980). Omdat cotrimoxazol en trimethoprim alléén, blijkens de geringe prevalentie van voor deze middelen resistente stammen, waardevolle middelen zijn binnen en buiten het ziekenhuis, is zorgvuldige controle van toe- of afname van resistentie voor deze middelen noodzakelijk.

De resultaten van dit onderzoek geven voor het eerst inzicht in de prevalentie van resistentie van *E. coli* bacteriën in Nederland voor een uitgebreide reeks antimicrobiële middelen. Deze gegevens geven ons reden tot zorg over de verdere ontwikkeling op dit terrein. Het is gewenst dat er een gestructureerd peilingssysteem voor het volgen van trends in resistentie tegen antimicrobiële middelen in het open milieu wordt opgebouwd.

E. coli stammen uit het ziekenhuis. In het ziekenhuis wordt bij ampicilline-resistente *E. coli* vaker gecombineerde resistentie met niet verwante stoffen als chlooramfenicol en tetracycline aangetroffen dan in de open bevolking. Dit kan alleen worden verklaard door de aanwezigheid van resistentie-plasmiden. Deze veronderstelling wordt verder ondersteund door de bevinding dat in het ziekenhuis vaker resistentie van *E. coli* tegen vier of meer middelen tegelijk wordt gevonden. Uit ons onderzoek is naar voren gekomen dat bij patiënten, die antimicrobiële therapie ontvangen, een overwegend resistente *E. coli* flora vaker voorkomt (zie tabel IV.2., 4. en 6.). Dit vormt vooral een ernstige bedreiging voor patiënten met een verminderde immunologische afweer. Bij deze groep patiënten komen vaak levensbedreigende infecties, veroorzaakt door endogene aërobe Gram-negatieve flora, met name door *E. coli* (Bodey 1975, Cohen e.a. 1983, Young 1983) voor. In deze gevallen vormt een hoge prevalentie van multipel resistente stammen in het ziekenhuis een bijzonder probleem bij de behandeling met antimicrobiële middelen. Omdat ook andere bacteriesoorten behorende tot de *Enterobacteriaceae* en *Pseudomonas* vaak verwekkers zijn van infecties is verder onderzoek naar de prevalentie van resistentie bij andere bacteriesoorten dan *E. coli* gewenst.

Hoofdstuk VI

Conclusies en aanbevelingen.

Met het in dit proefschrift beschreven onderzoek hebben wij een antwoord willen geven op een aantal in hoofdstuk I geformuleerde vragen. Deze vragen zijn:

1. Hoe groot is de omvang van de bacteriële resistentie in Nederland?
2. Zijn er risicogroepen in de open bevolking?
3. Hoe groot is de omvang van de bacteriële resistentie in het ziekenhuis?
4. Is er in het ziekenhuis een relatie tussen de omvang van de bacteriële resistentie en de hoeveelheid gebruikte antimicrobiële middelen?
5. Krijgen patiënten tijdens verblijf in het ziekenhuis meer resistente bacteriën?
6. Is resistentie bij bacteriën in het ziekenhuis even ernstig als daarbuiten?

Het onderzoek, dat is verricht om deze vragen te kunnen beantwoorden, is beperkt tot personen in de open bevolking en patiënten in het ziekenhuis met *E. coli* in faeces. Resistentie voor antimicrobiële middelen kan ook bij andere klinisch relevante bacteriesoorten voorkomen, maar deze soorten komen minder frequent voor.

De conclusies van het onderzoek kunnen als volgt worden samengevat en worden hier en daar van enkele aanbevelingen voorzien.

1. *De omvang van de bacteriële resistentie bij mensen die behoren tot de open bevolking.*

In het onderzoek naar de prevalentie van resistente stammen hebben wij ons beperkt tot de frequent voorkomende darmbacterie *Escherichia coli*. Stammen van deze bacteriesoort, resistent voor één of meer van drie in de huisartspraktijk veel toegepaste antimicrobiële middelen, werden bij 66% van de *E. coli* dragende respondenten uit de open bevolking gevonden. Deze middelen zijn ampicilline, tetracycline en sulfamethoxazol. Dit onderzoek is uitgebreid tot negen verschillende middelen. Het percentage respondenten dat drager is van voor één of meer van deze negen middelen resistente

E. coli, stijgt dan verder tot 81%. Resistente *E. coli* komt dus bij een steekproef van personen uit de open bevolking zeer frequent voor. Bij 27% van de respondenten blijkt zelfs de meerderheid van de *E. coli* flora in de darm resistent te zijn. Dit laatste gegeven kan van betekenis zijn voor de volksgezondheid. Wanneer patiënten met een overwegend resistente darmflora een urineweginfectie krijgen, is de kans groot, dat de verwekker resistent is (Lincoln e.a. 1970, Brumfitt e.a. 1971, Grüneberg e.a. 1976). Het aantal middelen waarmee de huisarts met succes de infectie kan bestrijden neemt daardoor af.

De aanwezigheid van een beperkt aantal resistente stammen in de darm kan leiden tot een overwegend resistente flora wanneer antimicrobiële middelen worden toegediend (Datta 1969, dit proefschrift, hoofdstuk IV, appendix). Dit is van betekenis voor ziekenhuissituaties waarin frequent infecties veroorzaakt door *Enterobacteriaceae* en met name door *E. coli* worden aangetroffen (CDC-NNIS Report 1977).

2. Groepen mensen in de open bevolking, die een bijzonder risico lopen voor het dragerschap van resistente *E. coli* stammen.

In het oorspronkelijke onderzoek in de open bevolking is gebleken dat mensen die recent een antimicrobieel middel hebben gebruikt of die contacten hebben onderhouden met de veehouderij vaker drager zijn van resistente stammen dan anderen. Dit geldt vooral voor resistentie voor tetracycline (tabel III.4.). In het onderzoek dat gericht was op het opsporen van bijzondere risico's bij respondenten met een overwegend resistente *E. coli* flora, hebben wij geen resistentie bevorderende factoren kunnen opsporen, die verband hielden met voeding, beroep of omgevingsfactoren. De wijde verspreiding van resistente stammen is blijkbaar een ongunstige milieufactor, waarvan de oorsprong moeilijk te achterhalen is. De uitgebreide literatuurgegevens over de bronnen van resistente stammen in het milieu (Linton 1977, Stuart-Harris 1982) geven aan hoe de kringloop van deze stammen is, maar geven geen informatie over de klinische relevantie. Gezien de hoge prevalentie van resistente *E. coli* stammen in het milieu bestaat echter alle aanleiding om de omvang van de resistentie periodiek te bewaken. Dit zou op de hierna volgende wijze kunnen gebeuren:

- Met regelmatige tussenpozen van bijvoorbeeld 5 jaar dienen peilstudies op verschillende plaatsen in ons land te worden verricht. Op grond van

de peilstudies dient een schatting te worden gemaakt van de prevalentie van resistente stammen in de bevolking. Uit praktische overwegingen kunnen deze peilstudies in de eerste plaats gericht zijn op de resistentie van *E. coli*. Andere bacteriesoorten zouden echter ook bij dit onderzoek betrokken moeten worden.

- De instituten die deze peilstudies gaan verrichten dienen te worden aangewezen en gesteund door overheidsinstanties die verantwoordelijk zijn voor de volksgezondheid en het veebedrijf.
- De peilstudies dienen te worden verricht in stedelijke populaties, bijvoorbeeld in de randstad en stedelijke populaties in het oosten van het land. Tevens worden peilstudies verricht in veeteelt-gebieden in de nabijheid van de stedelijke populaties.
- Het onderzoek kan beperkt van omvang zijn. In elk gebied kunnen honderd personen worden onderzocht. Uit ons onderzoek blijkt immers, dat de frequentie van resistente bacteriestammen in de bevolking hoog is (Gezondheidsraad-Voedingsraad 1977).
- Een permanente commissie van de overheid zal aan de hand van resultaten van de peilstudies richtlijnen moeten opstellen voor het gebruik van antimicrobiële middelen in de algemene praktijk. Hierbij kan gedacht worden aan richtlijnen die het gebruik van middelen, waarvoor een hoge prevalentie van resistentie wordt gevonden, moeten beperken. Deze richtlijnen kunnen zo nodig op grond van resultaten van nieuwe peilingen worden bijgesteld.

3. *Resistente stammen bij patiënten in het ziekenhuis.*

De frequentie waarmee resistente *E. coli* in faeces van patiënten in het ziekenhuis wordt aangetroffen, toont veel overeenkomst met de frequentie in de open bevolking. Er is echter verschil tussen patiënten in het ziekenhuis die wel en patiënten die geen antimicrobiële middelen krijgen toegediend. De eerste groep heeft significant vaker resistente *E. coli* en bevat vooral veel vaker patiënten met een overwegend resistente flora. Dit laatste geldt vooral voor ampicilline-resistentie.

De darmflora is een potentiële bron van endogene infecties voor patiënten en in het bijzonder voor patiënten met een verminderde weerstand (Van der Waay e.a. 1979, Guiot e.a. 1983, Wade e.a. 1983, Young 1983). Men zou het gebruik van antimicrobiële middelen, die aanleiding geven tot selectie van resistente stammen in de darm, moeten beperken. In de prak-

tijk is dit bij de behandeling van infectieziekten niet mogelijk. Bij de ontwikkeling van nieuwe antimicrobiële middelen zal men echter aandacht moeten besteden aan dit aspect. Bij de introductie van nieuwe antimicrobiële middelen zal bij patiënten onderzocht moeten worden, wat de invloed van deze middelen is op de gevoeligheid van de faecale flora.

4. De relatie tussen het voorkomen van resistentie en het gebruik van antimicrobiële middelen.

Er is een positieve correlatie tussen de hoeveelheid breedspectrum penicillines die op verschillende ziekenhuisafdelingen wordt omgezet en de frequentie waarmee resistente stammen bij patiënten op die afdelingen worden aangetroffen. Uit onderzoek van anderen is gebleken dat toenemende resistentie op een ziekenhuisafdeling omkeerbaar is door toediening van antimicrobiële middelen te staken of te verminderen (Bulger e.a. 1970, Price e.a. 1970, Mouton e.a. 1976). Afgezien van de hoeveelheid resistentie die patiënten vanuit het open milieu in het ziekenhuis introduceren (zie appendix hoofdstuk IV), lijkt ons onderzoek erop te wijzen dat elke ziekenhuisafdeling door de lokale gewoonte omtrent het gebruik van antimicrobiële middelen de omvang van de bacteriële resistentie zelf bepaalt. De grens van het toelaatbare wordt overschreden, wanneer men voorziet dat patiënten in het ziekenhuis infecties kunnen krijgen die op grond van de bacteriële resistentie onbehandelbaar zijn. Hiervoor is voortdurende bewaking van de bacteriële resistentie op ziekenhuisafdelingen nodig.

5. Acquisitie van resistente stammen in het ziekenhuis.

Bij een betrekkelijk kleine groep van 92 patiënten werden tijdens verblijf in het ziekenhuis geen verschuivingen van betekenis geconstateerd in de omvang van de resistentie. Sommige patiënten acquireren resistente stammen, anderen verliezen deze weer. Van patiënten, die geen antimicrobiële middelen krijgen toegediend, neemt het aantal met resistente bacteriën tijdens verblijf in het ziekenhuis niet toe. Patiënten die antimicrobiële middelen gebruiken, acquireren vaker resistente stammen, dan patiënten die geen antimicrobiële middelen gebruiken tijdens verblijf in het ziekenhuis.

6. *Resistentiepatronen van bacteriestammen binnen en buiten het ziekenhuis.*

Multipel resistente stammen worden in het ziekenhuis vaker aangetroffen dan daar buiten. Een hoge prevalentie van dergelijke stammen binnen het ziekenhuis is bijzonder ongewenst omdat daardoor de keuze van de beschikbare middelen wordt beperkt. Een hoge prevalentie van multipel resistente stammen vormt een dwingende reden voor het voeren van een restrictief beleid met betrekking tot het gebruik van antimicrobiële middelen binnen het ziekenhuis. Een aantal penicilline-derivaten, cefalosporines en aminoglycosiden kan bij de behandeling van ernstige infecties door een gevoelige flora levensreddend werken. Alleen bij een beperkt gebruik van deze middelen mag men verwachten dat de gevoeligheid van de flora behouden blijft. Deze middelen mogen dan ook alleen worden voorgeschreven bij de behandeling van ernstige infecties. Toepassing buiten het ziekenhuis, ook in de veterinaire sfeer, is niet geïndiceerd.

Binnen het ziekenhuis kan het gebruik van antimicrobiële middelen worden beperkt:

- door een commissie van deskundigen de plaatselijke opvattingen over de indicaties te laten formuleren.
- door het voorschrijven van een groep belangrijke antimicrobiële middelen in handen te leggen van een beperkt aantal stafleden,
- of ook door het voorschrijven te binden aan het opstellen van een geschreven motivatie en deze in de status van de patiënt op te nemen.

Samenvatting

In het onderzoek dat in dit proefschrift wordt beschreven, is getracht de omvang van de bacteriële resistentie in Nederland vast te stellen. Dit onderzoek is verricht bij de bacteriesoort *Escherichia coli*. De aanzet van dit onderzoek is gegeven door de onrust die is ontstaan over de gevolgen van het medisch en het niet medisch gebruik van antimicrobiële middelen. Tot nu toe was in Nederland nagenoeg niets bekend over de omvang van de bacteriële resistentie. De volgende vragen kwamen daarom naar voren (Hoofdstuk I):

1. Hoe groot is de omvang van de bacteriële resistentie in Nederland?
2. Zijn er risicogroepen in de open bevolking?
3. Hoe groot is de omvang van de bacteriële resistentie in het ziekenhuis?
4. Is er in het ziekenhuis een relatie tussen de omvang van de bacteriële resistentie en de hoeveelheid gebruikte antimicrobiële middelen?
5. Krijgen patiënten tijdens verblijf in het ziekenhuis meer resistente bacteriën?
6. Is resistentie bij bacteriën in het ziekenhuis even ernstig als daarbuiten?

De bacteriologische methode die werd toegepast om het onderzoek uit te kunnen voeren wordt beschreven in hoofdstuk II. Voor de isolatie van resistente *E. coli* stammen uit faecesmonsters is een semi- kwantitatieve selectieve kweekmethode gebruikt. Deze methode werd ook in peilstudies buiten Nederland toegepast (Hoofdstuk II.1.). De methode laat een berekening van het aantal resistente stammen ten opzichte van het totaal aantal bacteriestammen toe. Uit een vergelijkende studie tussen verschillende methoden voor de bepaling van de gevoeligheid van individuele bacteriestammen is gebleken, dat nieuwe gemechaniseerde methoden conventionele handmethoden kunnen vervangen (hoofdstuk II.2.). Voor de bepaling van de gevoeligheid van de in het onderzoek verzamelde bacteriestammen is in een latere fase van de studie de mechanische MS-2 methode gebruikt.

In de hoofdstukken III en IV is door epidemiologisch onderzoek getracht een antwoord te geven op de hierboven gestelde vragen. In hoofd-

stuk III wordt het onderzoek bij de open bevolking beschreven. Dit onderzoek heeft plaatsgevonden bij 741 personen van alle leeftijden in Zoetermeer en Overschie. Bacteriestammen die resistent zijn voor ampicilline, tetracycline of sulfamethoxazol werden gevonden bij respectievelijk 26%, 42% en 46% van de onderzochten. Dit zijn middelen, die in de huisartspraktijk veel worden gebruikt. Van de onderzochten was 66% drager van bacteriestammen die resistent waren voor één of meer van de drie middelen. Een bacterieflora die overwegend resistent (50% of meer van de stammen in faeces resistent) was voor ampicilline, tetracycline of sulfamethoxazol werd gevonden bij respectievelijk 6%, 12% en 20% van de onderzochten. Een overwegend resistente flora voor één of meer van de drie middelen kwam bij 27% van de mensen voor.

In de open bevolking werden personen aangetroffen die recent een antimicrobieel middel hadden gebruikt, of die werkzaam waren in de veehouderij. Onder hen werd frequenter dragerschap van resistente stammen aangetroffen dan onder de overige bevolking. Dit geldt vooral voor resistentie voor tetracycline. Omdat het niet duidelijk was waarom veel mensen bij wie geen recent gebruik van antimicrobiële middelen of een relatie met de veehouderij kon worden vastgesteld, drager waren van een overwegend resistente bacterieflora, is het onderzoek uitgebreid met een case control studie (hoofdstuk III, appendix). Deze aanvullende studie had tot doel factoren op te sporen, die blijkens literatuurgegevens zouden kunnen bijdragen aan het dragerschap van resistente bacterieflora. De respondenten die in het oorspronkelijke onderzoek een overwegend resistente flora bleken te bezitten en de controles, bij wie geen resistente stammen werden gevonden kregen een vragenlijst toegestuurd. De vragen hadden betrekking op dieet, beroep of omgevingsfactoren. Na analyse van de antwoorden konden geen bijzondere risicofactoren, die bijdragen aan de omvang van bacteriële resistentie, worden aangewezen. De conclusie van de studie in de open bevolking moet dan ook luiden, dat bacteriële resistentie een diffuus in het milieu verspreid probleem is, waarvan de oorsprong niet is te achterhalen.

In hoofdstuk IV wordt het onderzoek naar de omvang van de bacteriële resistentie in het ziekenhuismilieu beschreven. Dit onderzoek vond plaats in verschillende ziekenhuizen op verschillende afdelingen. Uit de resultaten kan worden geconcludeerd dat er een verschil bestaat in het dragerschap van resistente stammen tussen patiënten die wel en patiënten die geen antimicrobiële middelen kregen toegediend. Op vijf van de negen afde-

lingen, waar het onderzoek plaats vond, bedroeg het relatieve risico voor wat betreft het dragerschap van stammen die resistent zijn voor ampicilline bij patiënten met antimicrobiële therapie van 1,8 tot 5,0 ten opzichte van patiënten zonder antimicrobiële therapie. Voor wat betreft het dragerschap van een overwegend ampicilline-resistente bacterieflora varieerde dit relatieve risico van 2,1 tot 9,0. Verschillen in de frequentie van tetracycline- en sulfamethoxazol-resistente stammen kwamen veel minder vaak voor tussen de twee groepen patiënten. Dit onderzoek werd verricht bij patiënten op de tiende dag na opname in het ziekenhuis. Deze keuze is bewust gemaakt omdat aangenomen mag worden dat een periode van tien dagen voldoende moet zijn om de invloed van het gebruik van antimicrobiële middelen en van het ziekenhuismilieu op de bacterieflora te kunnen meten. De keuze van een langere periode zou hebben geleid tot een te groot verlies van te onderzoeken patiënten, omdat de gemiddelde ligduur in het algemeen niet langer is dan veertien dagen.

In een appendix bij hoofdstuk IV is het onderzoek beschreven waarin is nagegaan of resistente bacteriestammen tijdens verblijf in het ziekenhuis worden verkregen, ook als patiënten geen antimicrobiële middelen krijgen toegediend. Voor een groep patiënten van dezelfde afdeling is dit in dit onderzoek niet aangetoond, omdat sommigen resistente stammen acquireren, terwijl anderen resistente stammen verliezen. Van patiënten die geen antimicrobiële middelen krijgen, neemt het aantal, dat resistente bacteriën heeft, tijdens opname in het ziekenhuis niet toe. Na tien dagen verblijf in het ziekenhuis is een verschil te zien tussen patiënten die wel en patiënten die geen antimicrobiële therapie krijgen. De eerste categorie heeft vaker resistente stammen en bovendien heeft deze vaker nieuwe resistente stammen verkregen dan resistente stammen verloren.

Omdat de omzet van alle antimicrobiële middelen op de verschillende afdelingen in het jaar van onderzoek bekend was, is getracht een relatie aan te tonen tussen het gebruik van antimicrobiële middelen en het voorkomen van resistente bacteriestammen. Een positieve correlatie is gevonden tussen het gebruik van breedspectrum penicillines en het voorkomen van een overwegend ampicilline-resistente bacterieflora bij patiënten op de verschillende afdelingen. Deze relatie is niet gevonden op kinderafdelingen.

Uit de bacteriestammen die in de open bevolking bij personen van 6 jaar en ouder werden verzameld is een systematische steekproef getrokken. De stammen uit de steekproef zijn vervolgens met de mechanische MS-2

methode onderzocht op hun gevoeligheid voor negen antimicrobiële middelen. Dit onderzoek wordt besproken in hoofdstuk V. De prevalentie van resistentie van *E. coli* voor ampicilline, tetracycline, sulfamethoxazol en gentamicine is reeds bekend uit het onderzoek bij de open bevolking. Op grond van deze gegevens is met de resultaten van het onderzoek met de negen antimicrobiële middelen een gewogen schatting te maken van de prevalentie van resistentie voor deze middelen. Voor ampicilline, tetracycline, sulfamethoxazol en gentamicine is de prevalentie van resistentie bij personen van 6 jaar en ouder respectievelijk 25, 42, 45 en 0%. De gewogen schatting voor de overige met de MS-2 onderzochte middelen is: voor cefalotine 22%, voor nitrofurantoin 13%, voor cotrimoxazol 11%, voor chlooramfenicol 10% en voor kanamycine 7%. Er is geen amikacine-resistentie gevonden. Van de onderzochten is 81% drager van bacteriestammen die resistent zijn voor tenminste een van de negen middelen.

Onderzoek naar het voorkomen van resistentie voor negen antimicrobiële middelen bij ampicilline-resistente stammen, heeft aangetoond dat resistentie tegen vier of meer middelen tegelijk vaker voorkomt bij patiënten in het ziekenhuis dan bij personen uit het open milieu.

Tenslotte worden in hoofdstuk VI de belangrijkste conclusies van dit onderzoek besproken. Aan deze conclusies is een aantal aanbevelingen verbonden die, indien zij zouden worden opgevolgd, zouden kunnen leiden tot een stabilisatie of vermindering van de omvang van de bacteriële resistentie. In dit hoofdstuk wordt gepleit voor het verrichten van regelmatige peilingen naar het voorkomen van resistente stammen in het extramurale milieu op verschillende plaatsen in het land. In de intramurale sfeer is een restrictief antibioticumbeleid noodzakelijk ten einde de bruikbaarheid van klinisch belangrijke antimicrobiële middelen ook voor de toekomst te behouden.

Summary

In the study described in this thesis an attempt has been made to determine the extent of bacterial resistance in The Netherlands. It pertains exclusively to the species *Escherichia coli*. The study was prompted by the concern which has arisen about the consequences of the medical and non-medical use of antimicrobial drugs. So far, virtually nothing was known in The Netherlands about the extent of resistance of *E. coli*. The following questions therefore presented themselves (chapter I):

1. What is the extent of bacterial resistance in The Netherlands?
2. Are there at risk groups in the general population?
3. What is the extent of bacterial resistance in a hospital?
4. Is there a correlation between the extent of bacterial resistance in hospital and the amount of antimicrobial drugs used?
5. Do patients acquire resistant bacteria during their stay in hospital?
6. Is bacterial resistance in hospital as serious as elsewhere?

The bacteriological method used in this study is described in chapter II. A semi-quantitative selective culture method was used for isolation of resistant *E. coli* strains from faecal samples. The same technique has been used in pilot studies outside The Netherlands (section II.1.). The method permits a calculation of the number of resistant strains in relation to the total number of bacterial strains. A comparative study of different methods to determine the susceptibility of individual bacterial strains has shown that new, mechanized methods can replace the conventional manual methods (section II.2.). In a later phase of the study the mechanical MS-2 method was used to determine the susceptibility of the bacterial strains collected in this study.

In chapter III and IV an attempt is made to answer the above questions on the basis of epidemiological findings. Chapter III describes a general population study performed in 741 persons of all ages in Zoetermeer and Overschie. Bacterial strains resistant to ampicillin, tetracycline or sulphamethoxazole were found in 26%, 42% and 46%, respectively, of the group examined. These are drugs which are widely

used in general practice. Of the persons examined, 66% were carrier of bacterial strains which were resistant to one or more of the three drugs. A bacterial flora showing predominant resistance (50% or more of the strains in faeces being resistant) to ampicillin, tetracycline or sulphamethoxazole was found in 6%, 12% and 20% of those examined. A flora predominantly resistant to one or more of the three drugs was found in 27%.

In the general population persons were encountered who had recently used an antimicrobial drug or who worked in live-stock farming. Carriership of resistant strains was more frequently found among these persons than in the remaining population. Since it was not clear why many persons were carriers of a predominantly resistant flora although no recent use of antimicrobial drugs or a relation to live-stock farming could be established, the study was expanded with a case control study (chapter III, appendix). This supplementary study aimed at tracing factors which, according to data from the literature, could contribute to carriership of resistant bacterial flora. The respondents found to have a predominantly resistant flora and the controls not carrying resistant strains were sent a questionnaire with return envelope. The questions concerned diet, profession or environmental factors. Special risk factors contributing to the extent of bacterial resistance were not demonstrable after analysis of the responses. The conclusion from the general population study therefore has to be that bacterial resistance is a problem diffusely distributed in the environment, and that its origin cannot be traced.

Chapter IV considers the extent of bacterial resistance in a hospital environment. This was studied in several hospitals in different departments. The results obtained warrant the conclusion that there is a difference in carriership of resistant strains between patients who did and those who did not receive antimicrobial drugs. In five of the nine departments in which the study was performed, the relative risk of carriership of ampicillin-resistant strains for patients given antimicrobial medication ranged from 1.8 to 5.0 in relation to that for patients not receiving this medication. The relative risk of carriership of a predominantly ampicillin-resistant flora ranged from 2.1 to 9.0. Differences in frequency of tetracycline- and sulphamethoxazole-resistant strains were far less often found between the two groups of patients. This study was performed in patients on the tenth day after

admission. This interval was chosen deliberately because it may be presumed that a period of 10 days should be sufficient for measurement of the influence of the use of antimicrobial drugs and of the hospital environment on the bacterial flora. The choice of a longer period would have caused too great a loss of patients for examination, because the average hospital stay generally does not exceed 14 days.

In an appendix to chapter IV a study is described in which we have tried to establish whether resistant bacterial strains are acquired during the hospital stay even if the patients receive no antimicrobial drugs. We were not able to demonstrate this in a group of patients within the same ward because some acquire resistant strains whereas others lose them. The number of patients not receiving antimicrobial medication but nevertheless showing bacterial resistance, does not increase during the hospital stay. After 10 days in hospital there is a demonstrable difference between patients who do and those who do not receive antimicrobial drugs. The former category more often shows resistant strains, and more often acquires new resistant strains than loses them.

Since the turnover of all antimicrobial drugs in the various departments in the year of the study was known, an attempt was made to demonstrate a correlation between the use of antimicrobial drugs and the incidence of resistant bacterial strains. A positive correlation was found between the use of broad-spectrum penicillins and incidence in the different departments. No such correlation was found in children's wards (chapter IV).

A systematic random sample was drawn from bacterial strains collected in the general population of six years of age and older. The sensitivity of the strains in the sample to nine antimicrobial drugs was then tested with the aid of the mechanical MS-2 method. This study is discussed in chapter V. The prevalence of *E. coli* resistant for ampicillin, tetracycline, sulfamethoxazole and gentamicin has been known from the study of the open population. By means of these figures we have made a weighted estimation of the prevalence of resistance for the drugs tested with the MS-2 method. For people of six years and older resistance for ampicillin, tetracycline, sulfamethoxazole and gentamicin was found in 25, 42, 45 and 0% respectively. The estimation of resistance for the remaining antimicrobial drugs tested with the MS-2 system is for cephalothin 22%, for nitrofurantoin 13%, for cotrimoxazole 11%, for chloramphenicol 10% and for kanamycin 7%. No amikacin-resistance was

found. Of the persons examined 81% are carriers of bacterial strains which are resistant to at least one of the nine antimicrobial drugs.

A study of the incidence of resistance to nine antimicrobial drugs in ampicillin-resistant strains from hospital patients revealed that simultaneous resistance to four or more drugs is more frequently found in hospital than in extramural ampicillin-resistant strains.

In chapter VI the principal conclusions from this study are discussed. These are accompanied by a number of recommendations which, if followed, could lead to stabilisation or reduction of the extent of bacterial resistance. A plea is made for regular determination of the incidence of resistant strains in the extramural environment at different places in The Netherlands. In the hospital environment a restrictive antibiotics strategy is required if the efficacy of clinically important antimicrobial drugs is to be ensured for the future.

Literatuur

1. Ahart JG, Burton GC, Blenden DC. The influence of antimicrobial agents on the percentage of tetracycline-resistant bacteria in faeces of humans and animals. *J Appl Bacteriology* 1978; 44: 183-190.
2. Amies CR. A modified formula for the preparation of Stuart's transport medium. *Canadian J Publ Health* 1967; 58: 296-300.
3. Anderson ES. Origin of transferable drug-resistance factors in the *Enterobacteriaceae*. *Br Med J* 1965; 11: 1289.
4. Barnes WG, Green LR, Tally RL. Clinical evaluation of automated antibiotic susceptibility testing with the MS-2 system. *J Clin Microbiol* 1980; 12: 527-532.
5. Barry AL. The antimicrobial susceptibility test. Lea & Febiger, Philadelphia 1976.
6. Bauer AW. The two definitions of bacterial resistance. Stuttgart, IIIrd International Congress of Chemotherapy 1964; 484.
7. Bauer AW, Perry DM, Kirby WM. Drug usage and antibiotic susceptibility of staphylococci. *J A M A* 1960; 475-480.
8. Block CS. Gentamicin-resistant Gram-negative bacilli in hospital patients. *S A Medical Journal* 1978; 53: 391-395.
9. Bodey GP. Infections in cancer patients. *Cancer Treatment Reviews* 1975; 2: 89-128.
10. British Medical Journal. Editorial. Bacterial resistance to trimethoprim 1980; 6240: 571-572.
11. Broda P. Plasmids. WH Freeman and comp. Oxford, San Francisco 1979.
12. Brumfitt W, Faiers MC, Reeves DS, Datta N. Antibiotic-resistant *Escherichia coli* causing urinary-tract infection in general practice: relation to faecal flora. *Lancet* 1971; I: 315-317.
13. Bulger RJ, Larson E, Sherris JC. Decreased incidences of resistance to antimicrobial agents among *Escherichia coli* and *Klebsiella-Enterobacter*. *Ann Intern Med* 1971; 1: 65-71.
14. Burton GC, Hirsh DC, Blenden DC, Zeigler JC. The effects of tetracycline on the establishment of *Escherichia coli* of animal origin and in-vivo transfer of antibiotic resistance, in the intestinal tract of man. In: The normal microbial flora of man.

- FA Skinner, JG Carr eds., Soc Appl Bact Symposium series no.3. Academic Press London/New York 1974; 241-252.
15. Carlson JR, Conley FE, Cahall DL. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* susceptibility testing with the Abbott MS-2 system. Antimicrob Agents Chemother 1974; 4: 676-677.
 16. Casewell M, Phillips I. Food as a source of *Klebsiella* species for colonisation and infection of intensive care patients. J Clin Path 1978; 31: 845-849.
 17. CDC-NNIS Report 1977. Center for Disease Control National Nosocomial Infections Study Report. Hierholzer WJ. Nosocomial Bacterial Infections, tabel 5. In: Bacterial Infections in Humans, Epidemiology and Control. AS Evans, HA Feldman eds., Hoofdst. 20 - Plenum Medical Book Comp, New York, London 1982.
 18. Centraal bureau voor de statistiek, ministerie van volksgezondheid en milieuhygiëne. Vademecum gezondheidsstatistiek Nederland. 's-Gravenhage Staatsuitgeverij 1981; 144.
 19. Cleary TJ, Maurer D. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* susceptibility testing by an automated system, Autobac-1. Antimicrob Agents Chemother 1978; 13: 837-841.
 20. Cohen ML, Murphy MT, Counts GW, Buckner CD, Clift RA, Meyers JD. Prediction by surveillance cultures of bacteremia among neutropenic patients treated in a protective environment. J Infect Dis 1983; 5: 789-793.
 21. Cooke EM, Breaden AL, Shooter RA, Farrell SMO. Antibiotic sensitivity of *Escherichia coli* isolated from animals, food, hospital patients and normal people. Lancet 1971; II: 8-10.
 22. Cooke EM, Brayson JC, Edmondson AS, Hall D. An investigation into the incidence and sources of *Klebsiella* infections in hospital patients. J Hyg Camb 1979; 82: 473-480.
 23. Cooke EM, Sazegar T, Edmondson AS, Brayson JC, Hall D. *Klebsiella* species in hospital food and kitchens: a source of organisms in the bowel of patients. J Hyg Camb 1980; 84: 97-101.
 24. Cooke D, Salter AJ, Phillips I. Antimicrobial misuse, antibiotic policies and information resources. J Antimicrob Chemother 1980; 6: 435-443.
 25. Cooke MD. Antibiotic resistance among coliforms and faecal

- coliform bacteria isolated from sewage, sea-water, and marine shell-fish. Antimicrob Agents Chemother 1976; 9: 879-884.
26. Cowan ST. Cowan and Steel's Manual for the identification of medical bacteria. Cambridge University Press, Cambridge 1975.
 27. Curie K, Speller DCE, Simpson RA, Stephens M, Cooke DI. A hospital epidemic caused by a gentamicin resistant *Klebsiella aerogenes*. J Hyg Camb 1978; 80: 115-123.
 28. Damato JJ, Eitzman DV, Baer H. Persistence and dissemination in the community of R-factors of nosocomial origin. J Infect Dis 1974; 129: 205-209.
 29. Datta N. Drug-resistance and R-factors in the bowel bacteria of London patients before and after admission to hospital. Br Med J 1969; 2: 407-411.
 30. Datta N, Faiers MC, Reeves DS, Brumfitt W, Ørskov F, Ørskov I. R-factors in *Escherichia coli* in faeces after oral chemotherapy in general practice. Lancet 1971; I: 312-317.
 31. Davis CE, Anandan J. The evolution of R factor. A study of a "preantibiotic" community in Borneo. New Engl J Med 1970; 282: 117-122.
 32. Degener JE, Thonus IP, Michel MF. The antimicrobial susceptibility test: a comparison of the results of four methods. J Appl Bact 1981; 50: 505-517.
 33. Degener JE, Smit ACW, Michel MF, Valkenburg HA, Muller L. Gevoeligheid van Gram-negatieve aërobe darmflora voor tetracycline, ampicilline, sulfamethoxazol en gentamicine in een open bevolking in Nederland. Ned T Geneesk 1982; 126: 277-280.
 34. Degener JE, Smit ACW, Michel MF, Valkenburg HA, Muller L. Carriage of aerobic Gram-negative bacilli and drug resistance of *Escherichia coli* in different age-groups in Dutch urban communities. J Med Microbiol 1983; 16: 139-145.
 35. Duncan IBR, Rennie RP, Duncan NH. A long term study of gentamicin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a general hospital. J Antimicrob Chemother 1981; 7: 147-155.
 36. Ericsson HM, Sherris JC. Antibiotic sensitivity testing: Report of an International Collaborative Study. Acta pathologica et Microbiologica Scandinavica. Section B Microbiology 1971; 217: 1-90.
 37. Fabius GThJ. Standardization of susceptibility tests for

- antibiotics. (Thesis) Univ. Utrecht, The Netherlands 1979.
38. Falkow S. Infectious multiple drug resistance. Pion Ltd., London 1975.
 39. Feeney AR, Cooke EM, Shinebaum R. A comparative study of Gram-negative aerobic bacilli in the faeces of babies in hospital and at home. J Hyg Camb 1980; 84: 91-96.
 40. Gavan TL, Jones RN, Barry AL. Evaluation of the sensititre system for quantitative antimicrobial drug susceptibility testing. A collaborative study. Antimicrob Agents Chemother 1980; 17: 464-469.
 41. Gezondheidsraad-Voedingsraad. Advies inzake het gebruik van antibiotica. No. 2-24549 1977.
 42. Grüneberg RN, Shaw EJ. The influence of antibiotic treatment on resistance patterns of coliform bacilli in childhood urinary-tract infection. J Med Microb 1976; 9: 233-237.
 43. Grüneberg RN. Antibiotic sensitivities of urinary pathogens, 1971-8. J Clin Pathol 1980; 33: 853-856.
 44. Guinée PAM, Ugueto NR, Van Leeuwen WJ. *Escherichia coli* with resistance factors in vegetarians, babies and non-vegetarians. Appl Microb 1970; 20: 531-535.
 45. Guinée PAM, Frik JF, Van der Valk P. *E. coli* and resistance factors in piglets. Tijdschr Diergeneesk 1974A; 99: 401-409.
 46. Guinée PAM, Sekhuis VM, Ugueto NR. *Escherichia coli* met resistentiefactoren in effluënten en oppervlaktewateren. Tijdschrift voor watervoorziening en afvalwaterbehandeling 1974B; 8: 156-158.
 47. Guiot HFL, Van den Broek PJ, Van der Meer JWM, Van Furth R. Selective antimicrobial modulation of the intestinal flora of patients with acute nonlymphocytic leukaemia: a double blind, placebo-controlled study. J Infect Dis 1983; 4: 615-623.
 48. Hamilton-Miller JMT. Mechanisms and distribution of bacterial resistance to diamino pyrimidines and sulfonamides. J Antimicrob Chemother 1979; 5 (Suppl. B): 61-73.
 49. Hartley CL, Howe K, Linton AH, Linton KB, Richmond MH. Distribution of R-plasmids among the O-antigen types of *Escherichia coli* isolated from human and animal sources. Antimicrob Agents Chemother 1975; 8: 122-131.
 50. Hirsch DC, Ling GV, Ruby AL. Incidence of R-plasmids in fecal

- flora of healthy house-hold dogs. Antimicrob Agents Chemother 1980; 17: 313-315.
51. Hofman A, Valkenburg HA. Distribution and determinants of blood pressure in free-living children. In: Epidemiology of arterial blood pressure in free-living children. H Kesteloot, JV Joossens eds., Martinus Nijhoff Publishers b.v. The Hague, Boston, London 1980; 99-117.
 52. Howe K, Linton AH. The distribution of O-antigen serotypes of *E. coli* in normal calves, compared with man, and R-plasmid carriage. J Appl Bacteriol 1976; 40: 331-340.
 53. Jogerst GJ, Dippe SE. Antibiotic use among medical specialties in a community hospital. J A M A 1981; 8: 842-846.
 54. Joint Committee on the use of antibiotics in animal husbandry and veterinary medicine. Her majesty's stationery office London 1969.
 55. Johnston HH. Automation for sensitivity testing. J Antimicrob Chemother 1979; 5: 246-247.
 56. Jones AM. *Escherichia coli* in retail samples of milk and their resistance to antibiotics. Lancet 1971; II: 347-350.
 57. Jones RN, Thornsberry C, Barry AL, Gavan TL. Evaluation of the sceptor microdilution antibiotic susceptibility testing system: A collaborative investigation. J Clin Microb 1981; 13: 184-194.
 58. Latorracca R, Martins R. Surveillance of antibiotic use in a community hospital. J A M A 1979; 23: 2585-2587.
 59. Laverdiere M, Sabbath LD. Historical survey tests to determine bacterial susceptibility to antimicrobial agents. Mount Sinai J Med 1977; 44: 73-88.
 60. Van Leeuwen WJ, Van Embden J, Guinée PAM, Kampelmacher EH, Manten A, Van Schothorst M, Voogd CE. Afneming van het aantal tetracycline-resistente *Salmonella* stammen in Nederland. Ned T Geneesk 1979; 48: 2076-2078.
 61. Levy SB, FitzGerald GB, Maccone AB. Changes in intestinal flora of farm personnel after introduction of a tetracycline supplemented feed on a farm. New Engl J Med 1976; 295: 583-588.
 62. Lincoln K, Lidin-Janson G, Winberg J. Resistant urinary infections resulting from changes in resistance patterns of faecal flora induced by sulfonamide and hospital environment. Brit Med J 1970; 3: 305-309.

63. Linton KB, Lee PA, Richmond MH, Gillespie WA, Rowland AJ, Baker VN. Antibiotic resistance and transmissible R-factors in the intestinal coliform flora of healthy adults and children in an urban and a rural community. J Hyg Camb 1972; 70: 99-104.
64. Linton AH. Antibiotic resistance: the present situation reviewed. The veterinary Record 1977A; 100: 354-360.
65. Linton AH, Howe K, Bennett PN, Richmond MH, Whiteside EJ. The colonization of the human gut by antibiotic resistant *Escherichia coli* from chickens. J Appl Bact 1977B; 43: 465-469.
66. Markowitz SM, Veazy JM, Macrina FL, Mayhall CG, Lamb NA. Sequential outbreaks of infection due to *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit: Implication of a conjugative R-plasmid. J Infect Dis 1980; 1: 106-112.
67. Matsen JM, Barry AL. Susceptibility testing: Diffusion test procedures. In: Manual of Clinical Microbiology. Ed. by American Society for Microbiology, Washington D.C. 1974; 418-427.
68. McGowan JE, Finland M. Infection and antibiotic usage at Boston City Hospital: changes in prevalence during the decade 1964-1973. J Infect Dis 1974A; 129: 421-428.
69. McGowan JE, Finland M. Usage of antibiotics in a general hospital: effect of requiring justification. J Infect Dis 1974B 130: 165-168.
70. Mercer HD, Pocurull D, Gaines S, Wilson S, Bennett JV. Characteristics of antimicrobial resistance of *Escherichia coli* from animals. Relationship to veterinary and management uses of antimicrobial agents. Appl Microbiol 1971; 22: 700-705.
71. Monaghan C, Tierney K, Collieram E. Antibiotic resistance and R-factors in the fecal coliform flora of urban and rural dogs. Antimicrob Agents Chemother 1981; 19: 266-270.
72. Moorhouse EC. Transferable drug resistance in *Enterobacteria* isolated from urban infants. Brit Med J 1969; 2: 405-407.
73. Moss F, McSwiggan DA, McNicol MW, Miller DL. Survey of antibiotic prescribing in a district general hospital. Lancet 1981; II: 349-352.
74. Mouton RP, Glerum JH, Van Loenen AC. Relationship between antibiotic consumption and frequency of antibiotic resistance of four pathogens - a seven year study. J Antimicrob Chemother

- 1976; 2: 9-19.
75. Mouton RP, Van Klingeren B. Standaardisatie van gevoeligheidsbepalingen. Verslag van de Werkgroep Richtlijnen Gevoeligheidsbepalingen. Uitgebracht onder auspiciën van de Vereniging voor Infectieziekten 1981.
 76. NCCLS. Performance standards for antimicrobial disc susceptibility tests. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2nd Ed. 1979.
 77. Newsom SWB. Rapid sensitivity test. J Antimicrob Chemother 1977; 3: 201-203.
 78. O'Callaghan RJ, Rousset KM, Harkess NK, Murray ML, Lewis AC, Williams WL. Analysis of increasing antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* relative to changes in chemotherapy. J Infect Dis 1978; 3: 293-298.
 79. Petrocheilou V, Richmond MH, Bennett PM. Spread of a single plasmid clone to an untreated individual from a person receiving prolonged tetracycline therapy. Antimicrob Agents Chemother 1977; 12: 219-225.
 80. Price DJE, Sleigh JD. Control of infection due to *Klebsiella aerogenes* in a neurosurgical unit by withdrawal of all antibiotics. Lancet 1970; II: 1213-1215.
 81. Richmond MH, Linton KB. The use of tetracycline in the community and its possible relation to the excretion of tetracycline-resistant bacteria. J Antimicrob Chemother 1980; 6: 33-41.
 82. Rothman KJ, Boice JD. Epidemiologic analysis with a programmable calculator. NIH Publication 1979; no. 79: 1649.
 83. Salzman TC, Klemm L. Transferable drug resistance (R-factors) in *Enterobacteriaceae*: Relationship to nosocomial infections. Antimicrob Agents Chemother 1966; 2: 212-220.
 84. Scheckler WE, Bennett JV. Antibiotic usage in seven community hospitals. JAMA 1970; 2: 264-267.
 85. Selden R, Lee S, Wang WIL, Bennett JV, Eickhoff TC. Nosocomial *Klebsiella* infections: Intestinal colonisation as a reservoir. Ann Intern Med 1971; 5: 657-664.
 86. Siegel D, Huber WG, Enloe F. Continuous non-therapeutic use of antibacterial drugs in feed and drug resistance of the Gram-negative enteric flora of food producing animals.

- Antimicrob Agents Chemother 1974; 6: 697-701.
87. Shooter RA, Rousseau SA, Cooke EM, Breaden AL. Animal sources of common serotypes of *Escherichia coli* in the food of hospital patients. Lancet 1970; II: 226-228.
 88. Shooter RA, Cooke EM, Faiers MC, Breaden AL, O'Farrell SM. Isolation of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella* from food in hospitals, canteens, and schools. Lancet 1971; II: 390-392.
 89. Simmons HE, Stolley PD. This is medical progress? Trends and consequences of antibiotic use in the United States. J A M A 1974; 9: 1023-1028.
 90. Sjøgaard H, Zimmerman-Nielsen C, Siboni K. Antibiotic-resistant Gram-negative bacilli in a urological ward for male patients during a nine-year period: Relationship to antibiotic consumption. J Infect Dis 1974; 6: 646-650.
 91. Sturtevant AB, Feary TW. Incidence of infectious drug resistance among lactose-fermenting bacteria isolated from raw and treated sewage. Appl Microb 1969; 18: 918-924.
 92. Thornsberry C, Gavan TL, Sherris JC, Balows A, Matsen JM, Sabath LD, Schoenkecht FD, Thrupp LD, Washington II JA. Laboratory evaluation of a rapid, automated susceptibility testing system: Report of a collaborative study. Antimicrob Agents Chemother 1975; 7: 466-480.
 93. Thornsberry C, Anhalt JP, Washington II JA, McCarthy LR, Schoenkecht FD, Sherris JC, Spencer HJ. Clinical laboratory evaluation of the Abbott MS-2 automated antimicrobial susceptibility testing system: Report of a collaborative study. J Clin Microb 1980; 12: 375-390.
 94. Townsend TR, Shapiro M, Rosner B, Kass EH. Use of antimicrobial drugs in general hospitals I: Description of population and definition of methods. J Infect Dis 1979A; 139: 688-697.
 95. Townsend TR, Shapiro M, Rosner B, Kass EH. Use of antimicrobial drugs in general hospitals: IV. Infants and children. Pediatrics 1979B; 5: 573-578.
 96. Waay D Van der, Verhoef J. New criteria for antimicrobial therapy: Maintenance of digestive tract colonization resistance. Excerpta Medica. Amsterdam, Oxford 1979.
 97. Wade JC, De Jongh CA, Newman KA, Crowley J, Wiermike PH,

- Schimpff SC. Selective antimicrobial modulation as prophylaxis against infection during granulocytopenia: trimethoprim-sulfamethoxazole vs. nalidixic acid. *J Infect Dis* 1983; 4: 624-634.
98. Washington II JA, Sutter VL. Dilution susceptibility test: Agar and macro-broth dilution procedures. In: *Manual of microbiology*. EH Lennette, A Balows, WJ Hausler, JP Truant eds., Washington D.C. 1980; 453-458.
99. Weinstein RA, Nathan C, Gruensfelder R, Kabins A. Endemic aminoglycoside resistance in Gram-negative bacilli: Epidemiology and mechanisms. *J Infect Dis* 1980; 3: 338-345.
100. Williams Smith H. Anti-microbial drugs in animal feeds. *Nature* 1968; 218: 728-731.
101. Young LS. In: Michel MF : Antibiotic resistance in various municipalities in The Netherlands. Evaluation and management of hospital infections. R van Furth ed., Martinus Nijhoff publishers, The Hague, Boston, London 1982.
102. Young LS. Antimicrobial prophylaxis against infection in neutropenic patients. *J Infect Dis*. Editorial. 1983; 4: 611-614.

Nawoord

Bij het verschijnen van dit proefschrift wil ik allen danken, die hebben bijgedragen aan de totstandkoming hiervan.

In het bijzonder dank ik Prof. Dr. M.F. Michel voor het onderwijs dat ik van hem mocht ontvangen en voor de gelegenheid die hij mij bood om tijdens mijn opleiding met het onderzoek in het Bacteriologisch Laboratorium van het Ziekenhuis Dijkzigt te kunnen beginnen. Met grote werkkraft en opbouwende kritiek heeft u telkens het onderzoek begeleid.

Prof. Dr. H.A. Valkenburg ben ik dank verschuldigd voor de belangstelling waarmee hij vanaf het begin het onderzoek heeft gevolgd. De gastvrijheid van uw afdeling heeft in het bijzonder inspirerend gewerkt op de voortgang van het onderzoek. Hierdoor was het mogelijk dat ik toegang kreeg tot de bevolking van Zoetermeer.

Prof. Dr. K.F. Kerrebijn en Prof. Dr. R.P. Mouton, leden van de promotiecommissie, ben ik erkentelijk voor hun suggesties en de tijd die zij hebben willen besteden aan de beoordeling van het manuscript.

Dr. P.A.M. Guinée, Dr. A. Hofman en Dr. F. Klein ben ik een woord van dank verschuldigd voor de adviezen met betrekking tot de opzet van verschillende epidemiologische studies.

De huisartsen in Zoetermeer en de respondenten in het bevolkingsonderzoek wil ik bedanken voor hun positieve opstelling ten aanzien van het onderzoek.

Mevrouw G.J. de Graaf-Hoedemaker en de verpleegkundige staf van het consultatiebureau voor kleuters en zuigelingen te Overschie hebben ons in de gelegenheid gesteld materiaal voor onderzoek bij kinderen te verzamelen.

In het Diakonessenhuis Refaja te Dordrecht heb ik medewerking ontvangen van de bacteriologen Dr. J.H. Driessen en Dr. B.T. Lim en van de directie, de medische en de verpleegkundige staf om het onderzoek te kunnen verrichten bij patienten in een niet-academisch centrum. De heer G.L.F. van den Berg, ziekenhuishygiënist, heeft mij alle informatie verschaft die nodig was voor de organisatie van het onderzoek. Mevrouw T.G. Köhler, hoofd van de apotheek, heeft de gegevens over het gebruik van antimicrobiële middelen in het ziekenhuis beschikbaar gesteld.

De directie, de medische en verpleegkundige staven van het Academisch Ziekenhuis Rotterdam (Ziekenhuis Dijkzigt en Sophia Kinderziekenhuis), wil ik danken voor de gelegenheid die zij mij boden het onderzoek in een academisch centrum te kunnen verrichten. Met name ben ik dank verschuldigd aan de medische staf van de afdeling Inwendige Geneeskunde III (hoofd Prof. Dr. J.C. Birkenhäger) en aan Zr. J. van Tiggele en haar verpleegkundige staf voor de prettige samenwerking. Hierdoor kon de acquisitie studie tot een goed einde worden gebracht.

A. van Dijk en B.H. Graatsma, apothekers hebben mij geholpen bij het verzamelen van de gegevens over het gebruik van antimicrobiële middelen op de verschillende afdelingen in het Sophia Kinderziekenhuis en het Ziekenhuis Dijkzigt.

Van de analytische medewerkers dank ik in het bijzonder Anton Smit, die op zijn fiets winterse stormen heeft getrotseerd om in Zoetermeer de mensen thuis te kunnen bezoeken. Hij heeft gezorgd voor een accurate analyse van het materiaal en een overzichtelijke boekhouding op papier en in de computer van het Instituut Epidemiologie. In een latere fase hebben ook Ingrid Akkerman-Verzijden, Lilian Mooi en Jan van Oorschot een bijdrage aan het onderzoek geleverd. Jolanda Bekker-Wilthagen, Bram van Laar, Leo Muller en Carlie Valkenburg-Wolters hebben geassisteerd bij de verwerking van de gegevens en bij de uitvoering van de case control studie.

Linda Harkes heeft met veel doorzettingsvermogen het manuscript getypt en de tabellen vervaardigd. Ada Beukelman en Dr. D.J. Ruiter zijn bereid geweest de tekst te corrigeren.

Het Audio-Visueel Centrum, met name de heer C. de Vries, verzorgde vakkundig de figuren.

Alle collega's en medewerkers van het laboratorium ben ik erkentelijk voor het geduld dat zij met mij hebben gehad tijdens de uitvoering van het onderzoek. Dit laatste geldt ook voor mijn vrouw en kinderen.

Tenslotte wil ik mijn moeder en mijn grootmoeder bedanken voor de steun die zij mij altijd hebben gegeven om de opleiding te kunnen volgen die heeft uitgemond in dit proefschrift.

Curriculum vitae

De schrijver van dit proefschrift werd in 1950 te 's Gravenhage geboren.

1969 : Eindexamen gymnasium β aan het Rijnlands Lyceum te Wassenaar.

1969-1976 : Studie geneeskunde aan de Rijksuniversiteit te Leiden.

In 1973-1974 student-assistent op het Instituut voor Tropische Geneeskunde en het Laboratorium voor Parasitologie (hoofd Prof. Dr. C.F.A. Bruijning) van deze universiteit.

1976-1979 : Opleiding tot medisch microbioloog op de afdeling Bacteriologie (hoofd Prof. Dr. M.F. Michel) van het Academisch Ziekenhuis Rotterdam.

In deze periode werd een begin gemaakt met het onderzoek dat in dit proefschrift wordt beschreven. Het onderzoek werd in nauwe samenwerking met het Instituut Epidemiologie (hoofd Prof. Dr. H.A. Valkenburg) verricht.

1979-heden: Verbonden als staflid aan de afdeling Bacteriologie (hoofd Prof. Dr. M.F. Michel) van het Academisch Ziekenhuis Rotterdam.

Tot 1981 als medisch microbioloog werkzaam in het Sophia Kinderziekenhuis en daarna in het Ziekenhuis Dijkzigt.

In deze periode werd tweemaal een bezoek gebracht aan de medische faculteit van de Hasanuddin Universiteit te Ujung Pandang (Indonesië), voor het geven van onderwijs in de medische microbiologie.

